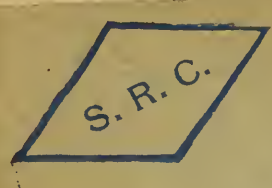





Do it with thy Might.









Fixirung, Färbung und Bau des Protoplasmas.

Kritische Untersuchungen über Technik und Theorie in der neueren Zellforschung

von

Dr. Alfred Fischer,
a. o. Professor der Botanik in Leipzig.

Mit einer colorirten Tafel und 21 Abbildungen im Text.

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1899.

Vorwort.

Die Methoden der Fixirung und Färbung, mit denen die neuere Zellforschung in die geheimsten Vorgänge des Zellenlebens einzudringen sich bemüht, haben sich allmählich ein so grosses Ansehen erobert, dass es gewagt und aussichtslos erscheinen dürfte, an ihnen und den auf ihnen ruhenden Theorien über den Bau des Protoplasmas und Kernes, über die Centralkörper und anderes Kritik zu üben. Wenn ich dennoch den enttäuschungsreichen Pfad beschreite, so geschieht es, weil ich durch fünfjährige Untersuchungen und Literaturstudien mich davon überzeugt habe, dass jeder, der sich mit Zellfragen beschäftigt, auch über die Grundlagen seiner Arbeitsmethoden sich unterrichten müsste und dass eine zusammenhängende Darstellung, die Altes mit Neuem verbindet, wohl von manchem dankbar aufgenommen werden könnte.

Die Vorlagen für die Abbildungen der Tafel und des Textes sind nach meinen Präparaten und Skizzen vom Herrn Kirchner in Leipzig meisterhaft gezeichnet worden, wofür ich ihm auch öffentlich danken möchte.

Dem Herrn Verleger gebührt mein besonderer Dank für die Bereitwilligkeit, mit der er den Verlag des Buches übernahm, und für die Sorgfalt und Liberalität, mit der er es ausstattete.

Leipzig, den 4. Juli 1899.

Dr. Alfred Fischer.

Inhalt.

II. Theil.

III. Theil.

I. THEIL.

Die Fixirung.

Literatur. Die zahlreichen, den mannigfachsten Ansprüchen genügenden Fixirungsmittel, über die man jetzt verfügt, sind wohl meistens rein empirisch herausprobirt worden, und nur in wenigen Fällen gingen die Erfinder neuer Mittel von chemischen Voraussetzungen aus. Darüber, dass alle Fixirungsmittel gerade dadurch brauchbar werden, dass sie Fällungsmittel für Proteinstoffe im weitesten Sinne sind, hat wohl bei den meisten Forschern kein Zweifel geherrscht. Das folgt schon aus zahlreichen, hie und da eingestreuten Bemerkungen über Artefacte, Ausfällungen, die entstanden waren. Besonders zu der Zeit, wo neben dem Alkohol die jetzt allgemein gebräuchlichen Fixirungsmittel aus der Reihe der Säuren und schweren Metallsalze auftauchten, wurde diese Frage häufiger aufgeworfen als jetzt, wo man im Allgemeinen allen Fixirungsmitteln ein grosses, wohl übergrosses und unberechtigtes Vertrauen entgegenbringt.

Ganz ablehnend gegenüber den in fixirten Präparaten beobachteten Protoplasmastructuren, fibrillären, netzigen und gerüstähnlichen Bildern spricht sich BERTHOLD (I, p. 62) aus, der sie durchweg für Ausfällungen coagulirbarer, ursprünglich in Lösung vorhandener Substanzen hält. So führt er auch (l. c. p. 69) die „rapide abtödtende Wirkung, welche Reagentien, wie Jod, Ueberosmiumsäure, Sublimat etc. auf lebendes Plasma ausüben“, auf die Coagulation der Eiweisskörper zurück.

Auch FRANK SCHWARZ (I, p. 151—154) hat gerüstähnliche Ausfällungen durch Reagentien im Protoplasma und Zellsaft von Pflanzenzellen beschrieben und hält, wie BERTHOLD, es nicht für berechtigt, „aus den an fixirten Zellen auftretenden Bildern auf eine bestimmte Structur zu schliessen“.

FLEMMING hat in allen seinen einzelnen Aufsätzen und besonders auch in seinem bekannten Buch über die Zelle (I) ein reiches Material über die Wirkung der Fixirungsmittel zusammengetragen, immer ihre fällenden Eigenschaften berücksichtigt, lebende Objecte und dasselbe Object nach verschiedenen Fixirungen stets zum Vergleich herangezogen. Es dürfte wohl der Hinweis auf FLEMMING's Buch hier genügen, bei der Besprechung der einzelnen Fixirungsmittel wird Näheres noch erwähnt werden.

Mehr beiläufige Notizen über die Wirkungsweise der Fixirungsmittel wird man beinahe in jeder Arbeit über die Zelle finden können; sie alle hier zusammenzutragen, wäre wohl ein überflüssiges Beginnen. Sehr oft merkt man diesen Erörterungen über die Möglichkeit, dass in den Präparaten Fixirungsartefacte und nicht nur ursprüngliche Structuren vorliegen könnten, es an, wie gern der Autor diese Kunstproducte aus der Welt schaffen möchte, damit alles, was zu sehen ist, auch wirkliche Structur sein müsste. Es wäre ja auch sehr einfach und schön, wenn die Fixirungsmittel ein ganz ungetrübtes Abbild der lebenden Structur lieferten. Da aber nicht alles in dem Protoplasma und Kern nut- und nagelfest ist, sondern ganz gelöst ist oder in einem stark verquollenen, einer Fällung immer noch ausgesetzten Zustande sich befindet, so werden solche Bedenken wohl immer sich einstellen.

Versuche, solche Zellstructuren auch künstlich nachzuahmen, ergaben sich aus solchen Bedenken von selbst und sind auch schon von verschiedenen Forschern gemacht worden. So zeigte BERTHOLD (I, p. 62), dass Hühnereiweiss beim Schütteln mit destillirtem Wasser zu Flocken von gerüstförmigem Bau sich zusammenballt. Dasselbe Eiweiss mit wässrigem Jod gab „jene feine Punktirung, die in den Beschreibungen von SCHMITZ so häufig wiederkehrt". Gerade diese, nicht weiter ausgedehnten Versuche bestimmen BERTHOLD zum Theil bei seiner Beurtheilung der protoplasmatischen Gerüstbilder aus fixirten Präparaten.

Ausführlicher hat FRANK SCHWARZ (I, p. 140—154) diese Frage behandelt. Er zeigt, dass colloidale Körper, um die es sich ja im Protoplasma vorwiegend handelt, in kleinen Tröpfchen und Kügelchen niedergeschlagen werden, deren Grösse von der Concentration der gefällten Lösung abhängt. Auch die Aneinanderlagerung solcher Körnchen zu fibrillären und gerüstähnlichen Massen wird geschildert. Als Versuchsobjecte benutzte SCHWARZ besonders Lösungen von Hühnereiweiss, die mit Alkohol, Pikrinsäure und FLEMMING's Gemisch gefällt wurden. Mit Peptonlösung erhielt SCHWARZ (I, p. 143) „wesentlich dieselben Bilder wie mit der Eiweisslösung".

Merkwürdiger Weise fällte SCHWARZ das Pepton nicht mit FLEMMING'scher Mischung, sondern nur mit Alkohol, Pikrinsäure und Jodlösung. So konnte er auch nicht den wichtigen Unterschied zwischen Granula- und Gerinnselbildnern auffinden, auf den ich bereits in meiner zweiten Mittheilung (II, p. 771) hingewiesen habe. Auch die Behauptung, dass die Beschaffenheit des Fällungsmittels keinen Einfluss auf die Form der Niederschläge hat, ist nicht allgemein giltig, für die wenigen von SCHWARZ geprüften Fälle mag sie ungefähr zutreffen. Die Concentration des Fixirungsmittels soll nur insofern wichtig sein, als die zur schnellen Fällung nothwendige Menge vorhanden sein muss. Auch dieser Satz ist nicht ohne weiteres anzunehmen. Ueber die Löslichkeit der entstandenen Niederschläge, die gerade für eine Kritik der Präparate und für eine mikrochemische Ausnutzung der Versuche wichtig ist, hat SCHWARZ nichts mitgetheilt. Ebenso fehlen Angaben über den Einfluss der chemischen Reaction des Fällungsmittels einerseits, der zu fällenden Lösung andererseits. Es kam FR. SCHWARZ nur darauf an, beiläufig einige protoplasmaähnliche Structuren künstlich zu erzeugen, eine Grundlage für eine Theorie der Fixirungsmethoden lag wohl nicht in seiner Absicht. So erklärt es sich auch, dass diese Beobachtungen keinen Eindruck auf die Histologen gemacht

haben und dass man vielfach unbeirrt an die Untrüglichkeit fixirter Präparate geglaubt hat.

Aehnliche Versuche mit verdünntem Hühnereiweiss hat auch Janošik (I, p. 32) angestellt, er erhielt mit Alkohol, Flemming'scher oder Müller'scher Lösung, mit Osmiumsäure „neben feinerer oder gröberer Granulirung auch reichliche, verschieden verflochtene oder zu Netzen angeordnete Fäden, welche dort, wo sie Netze bildeten, den gewöhnlichen Netzstructuren nicht unähnlich sahen". So erhebt auch Janošik Bedenken gegen die Präexistenz der nach der Fixirung sichtbaren Structuren.

Löwit (II, p. 114) versuchte Blutplättchen ähnliche Körperchen aus Paraglobulinlösungen herzustellen, die er nach Zusatz von etwas Harnstoff mit pulverisirtem Magnesiumsulfat fällte. Der Niederschlag bestand aus kleinen, farblosen scheibchen- oder tropfenförmigen Gebilden von 2—5 μ Durchmesser, die sich durch Osmiumsäure gewissermaassen fixiren liessen und dann auch mit Anilinfarben färbten. Sie sahen ganz wie Blutplättchen aus.

Ob noch weitere Versuche, mit Eiweisskörpern und Fixirungsmitteln Zellstructuren nachzuahmen, gemacht sind, vermag ich nicht zu sagen. Die mit anderen Stoffen unternommenen Versuche Bütschli's über Schäume berühren die hier zu behandelnden Fragen nicht.

Meine eigenen Untersuchungen gingen von der Granulatheorie aus, deren Grundlagen mir gegenüber der Artefactfrage nicht ganz einwurfsfrei zu sein schienen. Da Sphärokrystalle, zu denen wir doch sicherlich Granulafällungen zu rechnen haben, am ehesten bei den nicht coagulirbaren Peptonen und Albumosen zu erwarten waren, die ja viel weniger colloidal sind als andere Eiweisskörper, so wurden damit die ersten Versuche gemacht. Bald wurde die Untersuchung auf die übrigen Proteinstoffe ausgedehnt.

Kapitel I. Methodik und Material.

Besondere Methodik erfordern solche Versuche nicht. Am vortheilhaftesten ist es, die Lösungen der Eiweisskörper in kleinen Fläschchen oder in den bekannten Petri-Schalen der Bakteriologen mit den Fixirungsmitteln auszufällen. Nach 20—24 Stunden hat sich der entstandene Niederschlag auf dem Boden meist so fest abgesetzt, dass die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch Waschwasser ersetzt werden kann. Oft haften die Niederschläge so fest, dass direct unter der Wasserleitung bei mittlerem Ausfluss ausgewaschen werden kann. Auf diese Weise ist das Auswaschen in wenigen Stunden vollendet. Wenn die Niederschläge zu leicht abgeschwemmt werden, dann muss man durch wiederholten Wasserwechsel und Sedimentirung mehrere Tage lang auswaschen. Ueber die Versuche mit Hollundermark vergleiche man den III. Theil dieses Buches. Hier sei nur erwähnt, dass man Lösungen aller Proteinstoffe unter der Luftpumpe in Hollundermarkschnitte injiciren und dann unmittelbar unter dem Mikroskop den Einfluss der Fixirungsmittel (Schnelligkeit der Wirkung, Art der Fällung etc.) genau verfolgen kann.

Die gut ausgewaschenen, unlöslichen Niederschläge halten sich unter Wasser wochenlang und leiden nur sehr langsam durch Bakterien. Für spätere Benutzung bewahrt man die Fällungen in kleinen Fläschchen

unter Alkohol auf, der keinerlei Veränderungen in der Art der Fällung und ihrem Färbungsvermögen hervorbringt.

Diese beiden Eigenschaften, Art der Fällung und Färbungsvermögen, sind es, die man an den Niederschlägen studiren muss, um sie für die Beurtheilung der histologischen Methoden zu verwerthen. Die Form der Fällung kann man ja ohne weiteres an gewöhnlichen Wasserpräparaten untersuchen, an denen auch Vorversuche über die Färbung sich machen lassen. Besser ist diese aber an Deckglaspräparaten zu verfolgen, die in bekannter Weise nach Art der Bakterien- und Blutpräparate hergestellt sind.

Um ein vollständiges Bild derjenigen Vorgänge geben zu können, welche bei der Fixirung thierischer oder pflanzlicher Objecte sich abspielen und durch Bildung von Artefacten das mikroskopische Bild des fertigen Präparates beeinflussen können, würde es nothwendig gewesen sein, aus jeder der zahlreichen Gruppen der Proteinstoffe mindestens einen Vertreter zu untersuchen. Da aber viele dieser Stoffe in zuverlässig reinem und brauchbarem Zustande nicht zu beschaffen sind und die Herstellung jedes einzelnen eine besondere Arbeit für sich erfordert haben würde, so musste eine Auswahl getroffen werden. Da ferner diese Untersuchung die Grundlagen für die Beurtheilung der Fixirung und Färbung des Zellinhalts abgeben sollte, so konnte ja von allen denjenigen Proteinstoffen, wie Mucin, Keratin, Elastin und ähnlichen, die vorwiegend als Ausscheidungsproducte des lebenden Zellleibes erscheinen und als solche am Aufbau des Körpers sich betheiligen, abgesehen werden. Wenn auch sicher anzunehmen ist, dass auch die genannten Stoffe, die man als Proteide und Albuminoide zusammenzufassen pflegt, auch in gewissen Zellensorten sich finden, so darf man wohl zur Vereinfachung der Aufgabe voraussetzen, dass die Stoffe, aus denen Protoplasma und Kern jeder Zelle sich aufbauen und die auch in gelöstem Zustande vorkommen werden, zu der Gruppe der Eiweisskörper im engeren Sinne und der Nucleinkörper gehören. Unter diesen wurden dann diejenigen ausgewählt, die in zuverlässiger Qualität käuflich zu haben waren.

Die Unmöglichkeit, andere Proteinstoffe, auch gewisse ihrer Abbauproducte in reinem Zustande untersuchen zu können, wurde oft schwer empfunden. Ich glaube desshalb an dieser Stelle den Wunsch aussprechen zu dürfen, dass die physiologischen Chemiker die aus den Organismen isolirten Proteinkörper selbst auf ihr Verhalten gegenüber den histologischen Fixirungsmitteln prüfen oder prüfen lassen. Ich selbst würde für Uebersendung solcher Körper stets sehr dankbar sein und die Untersuchung nach den hier entwickelten Gesichtspunkten übernehmen. Auf diese Weise würde sich ein fruchtbares Zusammenarbeiten der physiologischen Chemie und der physiologischen Histologie anbahnen lassen; neue Einblicke in den Aufbau der lebenden Substanz würden sich eröffnen.

Die folgenden Untersuchungen über Fixirung, Färbung und Protoplasmastructuren erstrecken sich auf folgende Stoffe:

1) Verdauungsproducte des Eiweisses, Peptone und Albumosen. In meinen beiden ersten Mittheilungen (I, II) wurden diese Körper nur schlechthin genannt, was für den Zweck einer vorläufigen Ankündigung auch genügte. Später (III, p. 5) wurde der am meisten verwendete Stoff näher als Deuteroalbumose bezeichnet. Aus ihr besteht das Peptonum sicc. ex alcoh. praec. von Dr. Grübler

in Leipzig. Zur weiteren Verständigung in der schwierigen Nomenclatur der Verdauungsproducte sei, unter Hinweis auf die später zusammenzustellenden Fällungsreactionen, erwähnt, dass mir 3 Körper aus dieser Classe vorgelegen haben. Ein echtes Pepton, im Sinne Kühne's (I, p. 313; III, p. 450), verdanke ich meinem Collegen Siegfried: ein sehr hygroskopisches, gelbliches Pulver, schon in kaltem Wasser sehr leicht ohne Rest ganz klar löslich, das ganz frei von Albumosen war und specieller als Amphopepton zu bezeichnen wäre. Ferner die schon genannte Deuteroalbumose, weniger hygroskopisch und heller gelblich als das Pepton, in kaltem Wasser schwer, in heissem leicht löslich und dabei einen flockigen Rest von Verunreinigungen zurücklassend. Die klare, filtrirte Lösung wird durch Ammonsulfat ausgesalzt, gibt aber weder mit Salpetersäure, noch mit Ferrocyankalium und Essigsäure einen Niederschlag, ist also frei von primären Albumosen. Die in 5 Jahren bezogenen zahlreichen Präparate unterschieden sich nur wenig von einander und gaben mit den Fixirungsmitteln stets die erwarteten Fällungen. Die kleinen Schwankungen, die auch der Nachuntersucher beachten möge, rühren daher, dass das Präparat einmal etwas mehr nach dem Pepton neigt, ein anderes Mal zu den Protalbumosen, ohne dabei den Grundcharakter einer Deuteroalbumose zu verlieren. Solche kleine Schwankungen sind sowohl für die Fixirungsversuche, als auch für die Färbung und theoretischen Betrachtungen ganz bedeutungslos, weil doch immer noch die eng umschriebene Gruppe der Deuteroalbumose vorlag und die hiermit erzeugten Granulagemenge sich ganz einheitlich verhielten. Auch beseitigt das färberische Verhalten der echten Peptone und der Protalbumose jedes Bedenken dagegen, dass die später zu beschreibende Chromatophilie der Granula aus Deuteroalbumose auf einer chemischen Differenz der einzelnen Granula beruhen könne, die einer Beimengung von Pepton oder Protalbumose zuzuschreiben sei. Denn Protalbumose färbt sich genau so wie die Deuteroalbumose, und das Pepton ist so wenig tinctionsfähig und ausserdem so wenig fällbar, dass geringere Beimengungen davon, die man gerne zugestehen kann, gar nicht verwirren können.

Endlich Protalbumose (Hemialbumose von Grübler), kaum hygroskopisch, schwerer in heissem Wasser löslich als die vorige und auch mehr Rückstand lassend. Die Lösung filtrirt viel langsamer und verräth auch dadurch die näheren Beziehungen zum Eiweiss. Sie wird durch Ferrocyankalium und Essigsäure dick gefällt, ebenso durch 50-proc. Salpetersäure, in deren Ueberschuss sie sich aber wieder löst.

In der folgenden Darstellung wird die Deuteroalbumose kurzweg als Albumose bezeichnet werden, wenn sie nicht besonders von der primären unterschieden werden soll.

2) Albumine und Globuline, von ersteren Serum- und Eieralbumin, von letzteren Serumglobulin und ein aus der Krystalllinse hergestelltes Product. Alle diese Stoffe in reinem Zustande von Dr. Grübler bezogen.

3) Hämoglobin als Vertreter der Proteide, in reinem Zustande öfter bezogen, so dass durch viele Versuche kleine Schwankungen der Präparate ausgeglichen wurden. Ein Oxyhämoglobin reagirte nicht anders.

4) Nucleoalbumine (im Sinne HAMMARSTEN's): Casein und das pflanzliche Conglutin, ersteres sehr rein, letzteres in etwas geringerer Qualität, aber doch ausreichend und in seiner Reaction mit dem Casein übereinstimmend.

5) Nucleinkörper. Zur Verfügung stand ein gutes Nuclein aus Hefe, das die charakteristischen Reactionen ungetrübt zeigte, ferner zwei Nucleinsäuren. Die eine, ebenfalls aus Hefe, war wie das Nuclein von Dr. GRÜBLER bezogen und nach ALTMANN's grundlegenden Vorschriften in bester Reinheit dargestellt. Eine Nucleinsäure aus der Thymus verdanke ich der Güte des Herrn Professor KOSSEL-Marburg. Die Reinheit dieses werthvollen Productes verbirgt seine Herkunft vom Darsteller selbst.

Lösungsmittel war, soweit möglich, Wasser, in dem Albumosen und Peptone, ferner Hämoglobin stets gelöst wurden, Albumin und Casein dann, wenn dünnere Lösungen genügten. Um stärkere davon herzustellen, wurde schwaches Kali (0,2-proc.) verwendet, in dem auch unter leichtem Erwärmen bei 40 und 50° die Globuline, das Nuclein gelöst wurden. Um saure Lösungen zu erhalten, wurde die schwach alkalische mit dünner Essigsäure vorsichtig überneutralisirt, bis ein etwa entstandener Niederschlag sich wieder gelöst hatte. Die Hefenucleinsäure konnte bis zu 4 Proc. in warmem Wasser klar gelöst werden; daneben wurden auch schwach ammoniakalische und mit Essigsäure angesäuerte Lösungen davon gebraucht. Um 10-proc. Thymusnucleinsäure zu lösen, wurde 2-proc. Kali verwendet, ohne Schädigung des Präparates.

Die Reaction der untersuchten Lösungen ergiebt sich hieraus von selbst, theils alkalisch, theils sauer, auch rein neutral. Da gewisse Fixirungsmittel, wie Osmiumsäure, Kaliumbichromat bei alkalischer Reaction gar nicht fällen, andere dadurch doch etwas gehemmt werden, so wurden stets Parallelreihen mit beiden Reactionen untersucht, die entsprechend den im Thier- und Pflanzenkörper vorauszusetzenden Verhältnissen möglichst niedrig, 0,2—1-proc. freie Säure oder Alkali, genommen wurden.

Die Eiweisslösungen wurden alle salzfrei verwendet, nur in einigen Controlreihen mit Deuteroalbumose, Serumalbumin und Hämoglobin wurde physiologische Kochsalzlösung als Lösungsmittel benutzt. Ein so geringer Salzgehalt beeinflusst die Fällungsreaction mit den Fixirungsmitteln nicht, und so ist auch nicht anzunehmen, dass der Salzgehalt in thierischen Geweben, der ja hauptsächlich vom Kochsalz herrührt, die Fixirungserfolge irgendwie beeinträchtigt oder verschiebt. Die Erfahrungen der physiologischen Chemie, dass der Salzgehalt der Lösungen sehr oft den Eintritt oder das Unterbleiben einer Fällung der Eiweisskörper bestimmt, beziehen sich durchweg auf so hohen Salzgehalt, der in thierischen und pflanzlichen Zellen wohl nur in Specialfällen, z. B. bei den Halophyten, vorkommt. Die Fixirung der üblichen Untersuchungsobjecte der Histologie hat damit nicht zu rechnen.

Die Concentration der Eiweisslösungen ist nach verschiedenen Seiten sehr beachtenswerth. Bei zu geringem Gehalt an Eiweissstoffen bleibt die Fällung oft gänzlich aus oder äussert sich nur in einer mehr oder weniger starken Opalescenz, sehr hoher Concentration gegenüber kommen die Fixirungsmittel oft nur zu partieller Wirkung, und es bedarf dann einer sehr grossen Menge davon, um

die Lösung vollständig auszufällen. Um die Fällungsform festzustellen, genügt schon eine Concentration von etwa 2 Proc. Unabhängig von ihr ist der Bau des Niederschlages der später zu schildernden Gerinnselbildner: 0,5-proc. Serumalbumin liefert dieselben Gerinnselchen wie 10-proc. Dagegen ist die Korngrösse der Granula bei gleichem Fixirungsmittel abhängig von der Concentration, wie später an der Deuteroalbumose noch gezeigt werden soll.

Kapitel II. Die Fixirungsmittel.

1. Allgemeine Uebersicht.

Neben den einfachen Fixirungsmitteln wurde nur eine Auswahl der zahllosen zwei- und mehrfachen Gemische geprüft, die jetzt empfohlen werden. Denn die Beurtheilung der Gemischwirkungen hat stets von der Fällungskraft der einfachen Lösungen, die sich im Gemisch sehr verschiedenartig und ungleichmässig an der Fixirung betheiligen, auszugehen. Es wird genügen, an den gebräuchlichsten Gemischen diese zwar bereits allgemein angenommene, aber doch noch nicht genauer analysirte Sonderwirkung der einzelnen Componenten klarzulegen.

Die Fixirungsmittel nach ihrer chemischen Natur anzuordnen, hat für die hier verfolgten Zwecke keinen Werth, weil die verschiedenen Eiweisskörper von demselben Stoff oder derselben Körperclasse nicht in gleicher Weise beeinflusst werden. Auch die beliebte Unterscheidung saurer und neutraler Mittel gewährt keinen tieferen Einblick, weil sie nur einseitig die chemische Reaction des Fixirungsmittels betont und die Reaction des zu fixirenden Objectes nicht berücksichtigt. Denn die sog. neutralen Stoffe, wie Osmiumsäure, Kaliumbichromat, fällen saure Lösungen von Eiweisskörpern ebenso energisch wie die sog. sauren Fixirungmittel.

Auch eine andere Anordnung in oxydirende (Salpetersäure, Chromsäure, Osmiumsäure), reducirende (Formaldehyd) und inactive (Alkohol) würde nicht geeignet sein, obgleich nicht zu verkennen ist, dass oxydirende Wirkungen (WUSTER I, p. 355) in den Fixirungsprocess eingreifen. Noch weniger Werth hat es, die Fixirungsmittel einfach nach der Zahl ihrer Bestandtheile zu gruppiren, wie TELLYESNICZKY (I, p. 205—213) vorschlägt. Seine Arbeit berücksichtigt die Frage der Lebenstreue und feineren Zellstructur (I, p. 218) nicht und bemisst nur aus dem gröberen Erhaltungszustand von Kern und Protoplasma und deren Dimensionen den Werth der benutzten Lösungen.

Neben der chemischen Reaction der zu fällenden Eiweisslösungen kommt noch das specifische Verhalten des betreffenden Eiweisskörpers zu einem Fixirungsmittel in Betracht. Hieraus ist eine fixirungsanalytische Eintheilung der gebräuchlichen Lösungen abzuleiten. Es empfiehlt sich, drei Eiweisskörper gewissermaassen als Testobjecte herauszugreifen: 1) Nucleinsäure (aus Hefe), 2) Deuteroalbumose, 3) Serumalbumin. Die erstere wurde gewählt wegen ihrer engen Beziehungen zum „Chromatin", die Albumose könnte vielleicht als Verdauungsproduct in gewissen Geweben erscheinen, das Serumalbumin charakterisirt die beiden grossen, fixirungs-

technisch übereinstimmenden Gruppen der Albumine und Globuline, überhaupt die Gerinnselbildner.

In den Hauptgruppen gewährt dann die Löslichkeit oder Unlöslichkeit der Niederschläge in Wasser ein weiteres wichtiges Eintheilungsprincip. Wenn auch es ausgeschlossen ist, dass wasserlösliche Niederschläge schon beim Auswaschen der fixirten Objecte wieder entfernt werden, so geschieht dieses doch sicher bei der weiteren Behandlung der aufgeklebten Schnitte. Man wird in ihnen nach der vollendeten Färbung wohl kaum noch wasserlösliche Fällungen vorfinden, ausser vielleicht schwer löslichen.

Nach diesen Grundsätzen gruppiren sich die wichtigsten Fixirungsmittel, denen man leicht andere wird anfügen können, folgendermaassen:

I. Nucleinsäure wird nicht oder nur durch starke Concentration gefällt, Deuteroalbumose wird gar nicht, Serumalbumin sowohl aus alkalischen als sauren Lösungen gefällt.

Salpetersäure, Essigsäure und damit gesäuerter Alkohol. Unzuverlässige Fällungsmittel, die im Ueberschuss oft wieder lösen.

II. Nucleinsäure wird gar nicht, Deuteroalbumose und Serumalbumin werden nur aus sauren, nicht aus alkalischen (oder neutralen) Lösungen gefällt. Die Niederschläge sind unlöslich.

Osmiumsäure, Kaliumbichromat, ALTMANN's Gemisch, MÜLLER-sche Lösung.

III. Nucleinsäure, Deuteroalbumose und Serumalbumin werden bei jeder Reaction gefällt.

1) Die Fällung der Nucleinsäure und der Deuteroalbumose ist in Wasser leicht löslich; Serumalbumin wird coagulirt.

Alkohol, Aceton, Pikrinsäure, Pikrinschwefelsäure.

2) Alle Fällungen in Wasser unlöslich.

Chromsäure, Sublimat, Platinchlorid, Formaldehyd, FLEMMING's Gemisch (Chromosmiumessigsäure), HERMANN's Gemisch (Platinchloridosmiumessigsäure).

Hier würden sich noch die meisten Gemische anschliessen, z. B. Chromessigsäure, Chromameisensäure, Chromsäureplatinchlorid, Sublimatessigsäure, kurz alle, die mit Chromsäure oder Sublimat oder Platinchlorid versetzt sind, wenn auch die andere Componente zu Gruppe I, II oder III 1 gehört.

Die beiden einzigen alkalischen Lösungen, die bis jetzt zu Fixirungszwecken benutzt worden sind, Lysol (REINKE I, p. 415—420) und Laugenalkohol (HELD II, p. 207) sollen später kurz erwähnt werden.

2. Die Fällungskraft der Fixirungsmittel.

Um den Werth der einzelnen Mittel genauer einzuschätzen, ist noch das Verhalten gegenüber anderen Eiweisskörpern zu ergänzen und die besondere Eigenthümlichkeit jedes einzelnen Fixirungsmittels an Beispielen zu erläutern. Die obige Gruppirung wird dabei einige Mal etwas eingeschränkt werden müssen, aber in den Grundzügen doch sich bewähren.

I. Gruppe. Nucleinsäure wird nicht oder nur durch stärkere Concentrationen, Deuteroalbumose gar nicht, Serumalbumin aus sauren und alkalischen Lösungen gefällt

Diese Fällungsmittel müssen desshalb als unzuverlässig bezeichnet werden, weil sie, stärker verdünnt, oft anders wirken als concentrirt und ausserdem die Fällungen mancher Eiweisskörper theilweise oder ganz im Ueberschuss wieder löslich sind.

1. Salpetersäure.

Salpetersäure (3- oder 50-proc.) fällt echte Peptone und Deuteroalbumosen nicht (vergl. auch Neumeister I, p. 266; II, p. 336; III, p. 187), letztere nur bei so hohem Salzgehalt, der in der Zelle wohl nie erreicht wird. Primäre Albumose wird erst von stärkerer Salpetersäure reichlich gefällt, im Ueberschuss aber wieder gelöst. Albumine und Globuline trüben sich zwar mit 3-proc. Salpetersäure, klären sich aber durch weiteren Zusatz vollständig. Dagegen gibt 50-proc. dauerhafte, unlösliche Niederschläge. Hämoglobin, Casein, Nuclein und Nucleinsäure wird von den beiden benutzten Concentrationen unlöslich ausgefällt. Diese Niederschläge sind zwar in Wasser meistens unlöslich, aber doch nicht alle, z. B. Caseinflocken (mit 3-proc. Salpetersäure), lösen sich doch in 1—2 Tagen vollkommen wieder auf. Man wird daher nach Salpetersäurefixirungen recht schwankende Bilder zu erwarten haben, auch wenn man nur 3-proc. benutzt. Altmann's (II, p. 221) Behauptung, dass „man durch jene dünne Salpetersäurelösung (3—$3^1/_2$-proc.) die wirkliche Structur eines protoplasmatischen Objectes am zuverlässigsten erlangt", verträgt sich mit der hervorgehobenen Unzuverlässigkeit freilich nicht.

Ein Niederschlag mag wohl Hermann (I, p. 91, Fig. 46) vorgelegen haben, als er mit Salpetersäurefixirung ein „sehr deutliches, derbes Chromatinnetz" in Kernen des Salamanderhodens fand, in denen nach Fixirung mit dem Platinosmiumgemisch nur recht wenig Chromatin zu erkennen war.

Alkohol (90 Proc.) mit Salpetersäure (10 Proc.) ist ebenso launisch wie die wässrige dünne Säure, denn die coagulirende Wirkung des Alkoholes wird nicht selten so geschwächt, dass z. B. Serumalbumin und Hämoglobin auch nach längerem Stehen unter dem Gemisch noch langsam sich in Wasser lösten.

2. Essigsäure.

Essigsäure allein in verschiedener Concentration würde noch mehr, als die vorige, unsichere und trügerische Bilder geben können, weil sie die Fällungen der Albumine, Globuline und Nucleoalbumine bald leichter, bald schwerer im Ueberschuss wieder löst und so dem Entwässerungsalkohol bald mehr, bald weniger Gelegenheit zu secundären Ausfällungen und Nachfixirungen gewährt. Gar nicht gefällt werden Peptone und Albumosen, während die Nucleinsäure (aus Hefe) je nach der Concentration der Säure und der Reaction der Lösung sich verschieden verhält. Eine rein wässrige, stark saure Lösung der Nucleinsäure kann man mit ziemlich viel verdünnter (1—5-proc.) Essigsäure

versetzen, ohne dass sie sich trübt. Stärkere Säure aber, 10-proc. und höhere, fällen auch die Nucleinsäure vollständig und im Ueberschuss unlöslich. Auch Wasser nimmt diese Niederschläge nur langsam wieder auf, weshalb selbst in fertig gefärbten Schnitten noch sehr wohl Reste übrig bleiben könnten. Alkalische Nucleinsäurelösungen widerstehen noch länger der Essigsäure als die wässrigen, werden aber von so hoher Concentration, wie in VAN BENEDEN's Alkohol-Eisessig, doch auch gefällt. Im Allgemeinen kann also die Essigsäure als ein sehr launisches Fällungsmittel für Nucleinsäure bezeichnet werden.

Der Essigsäure-Alkohol ist ebenso zu beurtheilen wie der mit Salpetersäure versetzte, vielleicht sogar noch unzuverlässiger als dieser.

Setzt man die Essigsäure anderen Fixirungsmitteln zu, wie in den allbekannten Gemischen FLEMMING's und HERMANN's und in vielen anderen, so tritt ihre fixirende Wirkung weit zurück hinter der eines Ansäurers. Sehr viele Zellinhalte, wohl die meisten, reagiren alkalisch und würden dadurch gewissen Fixirungsmitteln, wie der Osmiumsäure, dem Kaliumbichromat, ganz unzugänglich sein, andere je nach dem Grad des freien Alkalis mehr oder weniger hemmen, z. B. auch das Platinchlorid und die Chromsäure. Denn weder diese, noch das Platinchlorid in HERMANN's Lösung würden ausreichen, um der Osmiumsäure als Ansäurer zu dienen. Einmal desshalb, weil sie schneller als die langsam wirkende Osmiumsäure an die Gewebselemente gebunden werden würden, und zweitens selbst doch nur schwach und sehr schwach „sauer“ sind. Ueber diese Wirkung der Essigsäure als Wecker der Fällungskraft vergleiche man auch den zweiten Grundversuch der Strahlung im Hollundermark mit alkalischer Albumoselösung.

Auch in dem von KULTSCHITZKY (I, p. 348) als besonders zuverlässig empfohlenen Fixirungsmittel aus 50-proc. Alkohol, Kupfervitriol, Kaliumbichromat und Essigsäure spielt die letztere die Rolle eines Ansäurers und gibt so Gelegenheit zu Ausfällungen. Diese Aufgabe der Essigsäure hat auch TELLYESNICZKY (I, p. 205, 238) nicht erkannt.

Die Literatur enthält zahlreiche Angaben über Einwirkung von Essigsäure auf Kern und Protoplasma, von denen noch einige hier hervorzuheben sind.

F. SCHWARZ (I, p. 135) schildert, dass durch 1 proc. Essigsäure feine protoplamatische Tröpfchen und Fädchen in Mniumblattzellen bald ihre scharfe Begrenzung verlieren und sich zu kleinen Klümpchen zusammenballen, die allmählich erstarren. FLEMMING (IV, p. 101—103) hat die Wirkung der Essigsäure auf die Eikerne von Najaden (Unio, Anodonta) genau beschrieben. Frische, eben dem Eierstock entnommene Eier zeigten in ihrem Kerninnern ein dürftiges, sehr lückenhaftes, dünnes und blasses Gerüst (Figuren bei FLEMMING I, p. 104, $E_1 a$ und $E_2 1$), bei Zusatz von Essigsäure traten mit einem Schlage reichliche Stranggerüste auf, die bei geringer Concentration der Säure (1-proz. und weniger) dauernd sich erhielten, bei höherer aber (5-proc. und mehr) bald wieder verblassten und verschwanden. Man vergleiche hierzu in FLEMMING IV, Fig. 17 und 20, und in FLEMMING I, p. 104, Fig. $E_1 a$ und $E_2 3$. Damals (IV, 1875) deutete FLEMMING nur diejenigen Stränge und Gerüste als ursprünglich vorhanden, welche schon vor der Einwirkung der Essigsäure da

waren, alle erst dann erscheinenden hielt er für Gerinnungen des Kerninhaltes. In seinem Zellenbuche (I, p. 103, Anmerkung 2) kommt FLEMMING auf jene Beobachtungen zurück und betrachtet jetzt auch die durch Essigsäure hervorgerufenen Gerüste für präformirt, freilich mit der Bemerkung, dass noch feinkörnigere Gerinnungen hinzukommen können. Meiner Ansicht nach erklärt sich dieser typische Fall anders. Alle bei Essigsäurezusatz erscheinenden Gerüste sind Ausfällungen von Proteinstoffen, die im Ueberschuss, hier also 5-proc. Essigsäure und und mehr sehr bald löslich sind, bei schwächerer Concentration aber (1-proc. und weniger) genügt die ganze dem Präparat zugesetzte Menge nicht, um die Ausfällung wieder zu lösen. Man kann dieselbe Erscheinung sehr schön an Hollundermarkschnitten, die mit alkalischer Casein- oder Serumalbuminlösung injicirt sind, hervorrufen. Die Eiweisskörper waren in 0,2 proc. Kalilauge gelöst und wurden auf Zusatz von 0,2—1 Proc. Essigsäure sofort gefällt, die Fällung erhielt sich, wurde aber z. B. durch weiteren Zusatz von 5-proc. Essigsäure ebenso schnell gelöst, wie durch Zusatz von 0,2 KOH. Im ersten Falle also eine Lösung der essigsauren Fällung durch einen Ueberschuss des Fällungsmittels, im anderen Falle durch Neutralisation. Wendet man sogleich 5-proc. Essigsäure an, so erhält man bald wieder verschwindende Ausfällungen. Es ist selbstverständlich, dass von der Stärke der Alkalescenz einer Eiweisslösung es abhängt, welche Säureconcentration dauernde, welche schnell verschwindende Fällungen ergeben. Auch für die Zellkerne ist das sehr zu beachten.

Eine ähnliche Wirkung der Essigsäure auf Kerne der Blasenwand, der Epithelien und der Blutzellen des Salamanders ist ebenfalls von FLEMMING (V, p. 698) beschrieben worden. Wenn schon $^1/_{10}$-proc. Essigsäure genügte, um momentan ein äusserst scharf ausgesprochenes, mit der Kernwand überall zusammenhängendes Gerüst erscheinen zu lassen, so folgt daraus, wie schwach alkalisch die Lösung im Kerninnern war.

Das Verschwinden der Kerngerüste in stärkerer Essigsäure ist auch ein Beweis dafür, dass sie nicht aus Nuclein oder Nucleinsäure bestehen, denn diese würden unlöslich sein.

AUERBACH (I, p. 90) möchte zwar das Hervortreten körnigen Inhalts im Zellkern bei Essigsäurebehandlung in der Hauptsache nicht als eine Fällung deuten, giebt aber doch die Möglichkeit zu, dass ausgefällte Körnchen sich beimischen könnten. Später (II, p. 740) erklärt aber AUERBACH alle intranucleären Netze als „durch die Präparation theils unabsichtlich erzeugte, theils planmässig in schönster Form hervorgerufen".

Auch BÜTSCHLI (I, p. 250) ist überzeugt davon, dass Essigsäure (1-proc.) Gerinnungsbilder in den Kernen hervorrufe. O. HERTWIG (III, p. 164 und 191) sah die Kernkörperchen der Eier von Asteracanthion und Ascidia intestinalis bei Essigsäurezusatz dunkelkörnig gerinnen.

II. Gruppe. Nucleinsäure wird gar nicht, Deuteroalbumose und Serumalbumin werden nur aus sauren, nicht aus schwach alkalischen (oder neutralen) Lösungen gefällt. Die Niederschläge sind in Wasser unlöslich.

Die hierher gehörigen Fixirungsmittel werden in der Histologie gewöhnlich als neutral bezeichnet, was eigentlich nur für die Osmium-

säure und das kaum benutzte Jodkaliumquecksilberjodid gilt. Denn Kaliumbichromat röthet Lackmuspapier und ist nur insofern als neutral zu betrachten, als es zur Aeusserung seiner fällenden Eigenschaften noch freier Säure bedarf, da die Chromsäure des Salzes allein zu schwach ist.

1. Osmiumsäure (Osmiumtetroxyd).

Eine 1-proc. Lösung von Osmiumsäure fällt weder aus saurer, noch neutraler oder alkalischer Lösung: die Nucleoalbumine (Casein, Conglutin), Nuclein und Nucleinsäure aus Hefe. Ferner werden alkalische Lösungen von Deuteroalbumose und Protalbumose, der Albumine und Globuline nicht gefällt und bleiben tagelang klar. Bei geringem Ansäuern mit Essigsäure fallen die genannten Stoffe sofort in wasser-unlöslicher Form aus. Dass saure Lösungen sogleich gefällt werden, ergiebt sich hieraus von selbst. Hämoglobin wird auch aus neutraler oder sogar schwach alkalischer Lösung abgeschieden, aber doch nur sehr langsam, im Verlaufe mehrerer Tage. Amphopepton wird gefällt.

Osmiumsäure allein ist demnach ein sehr schwaches und unvollständiges Fällungsmittel, alkalischem Zellinhalt gegenüber wird sie stets versagen. Besonders interessant ist noch ihr Verhalten gegen Nucleoalbumin, Nuclein und Nucleinsäure, jene Körper also, die im Zellkerne sicher vorkommen und manchen Forschern als die Hauptträger der Kerneigenschaften gelten. Osmiumsäure allein könnte Nucleinkörperbildungen des Kernes, etwa Chromosomen gar nicht fixiren, d. h. widerstandsfähig gegen die weiteren Manipulationen wie Auswaschen, Entwässern, Behandlung mit sauren Alkoholen beim Färben der Schnitte u. s. w. machen. Es eröffnet sich hier mancher vielversprechende Ausblick auf neue Untersuchungen über die Ursprünglichkeit und natürliche Dauerhaftigkeit der Chromosomen und anderer Kernbestandtheile. Gegenüber den Nucleoalbuminen und Nucleinkörpern, soweit sie geprüft wurden, wird das Verhalten der Osmiumsäure durch die chemische Reaction nicht beeinträchtigt, sie wirkt überhaupt nicht. Ganz anders compliciren sich aber die Verhältnisse für die Albumosen, Albumine und Globuline. Kommen sie in alkalischen Zellen oder Kernen gelöst vor, so giebt die reine Osmiumsäure keine Fällung, während natürlich Chromsäure, Platinchlorid, Sublimat und alle sauren Osmiumgemische Niederschläge erzeugen.

Für die weiteren Veränderungen, die mit Osmiumsäure 20 Stunden fixirte alkalische Gewebsstücke bis zur Ueberführung in Xylol erfahren, ergeben sich folgende Gesichtspunkte. Alle in den Geweben etwa gelösten Nucleoalbumine und Nucleinkörper, ferner alle Peptone, Albumosen, Albumine und Globuline, auch Hämoglobine — man kann kurz sagen sämmtliche gelöste Eiweisskörper — sind nicht gefällt. In diesem Zustande beginnt das Auswaschen, d. h. durch Diffusion und Dialyse, soll das Fixirungsmittel wieder entfernt werden. Gelöste Eiweisskörper diffundiren nur äusserst langsam, selbst der schnellste unter ihnen, das Pepton, diffundirt nach KÜHNE (I, p. 23) nur $^1/_4$ so schnell wie Traubenzucker. Beim Auswaschen von Gewebsstücken handelt es sich aber um Dialyse, um Durchwandern thierischer Membranen oder membranartiger Bildungen, durch die wohl die Osmiumsäure hindurchwandern kann, aber sicher nicht die gar nicht dialysirbaren Eiweisskörper, die auch die Cellulosemembranen

der Pflanzenzellen nur schwer passiren können. Selbst wenn man die Zeit des Auswaschens über das übliche Maass weit ausdehnen wollte, würde man doch die gelösten, von der Osmiumsäure nicht gefällten Eiweisskörper nicht entfernen können. Noch weniger geschieht das beim allmählichen Entwässern mit steigendem Alkohol, so dass dieser, wenn er fällungskräftig geworden ist, nunmehr alle diejenigen Eiweisskörper ausfällt, die ihm zugänglich sind. Da freie Säure oder Alkali beim Auswaschen dialytisch entfernt worden sind, so kann man annehmen, dass der Entwässerungsalkohol auf neutrale Gewebe wirkt. Es würden nunmehr sicher gefällt: Pepton, Albumosen, Albumine, Globuline, Hämoglobin, Nucleoalbumine, Nucleine und Nucleinsäure; ausser Pepton, Albumosen und Nucleinsäure werden alle die genannten Eiweisskörper durch den langen Aufenthalt in Alkohol coagulirt. Sie müssen also im fertigen Schnitt als Structuren vortäuschende Fällungen berücksichtigt werden. Absoluter Alkohol würde auch aus alkalisch gebliebenen Gewebsstücken alle oben genannten Einweisskörper ausfällen.

Der Vortheil, den also eine Osmiumfixirung alkalischer oder neutraler Gewebe wegen der geringen Fällungskraft der Omiumsäure vielleicht bieten könnte, wird durch die Nachbehandlung mit Alkohol aufgehoben. In Paraffinschnitten wird man neben der Wirkung der Osmiumsäure eine kräftige Fixirung durch Alkohol vor sich haben. Hierauf hat bereits im Anschluss an meine früheren Mittheilungen und nach weiteren gemeinsamen Besprechungen Held (II, p. 209 und 210, Anmerk.) hingewiesen. Bei Held handelt es sich um die Nissl-Körper der Nervenzellen und das Altmann'sche Bichromatosmiumgemisch, für das dasselbe gilt wie für reine Osmiumfixirung.

In sauren Gewebsstücken werden durch die Osmiumsäure nur die Nucleoalbumine, Nucleine und Nucleinsäure nicht gefällt, woraus sich die secundären Wirkungen des Einbettungsalkoholes nach Obigem leicht ableiten lassen. Manche Angaben über langsames Eindringen der Osmiumsäure und daher ungleichmässige Fixirungswirkung in der Peripherie und im Innern der Stücke (Rawitz I, p. 18) bedürfen jedenfalls einer neuen Prüfung über etwaige Nachwirkungen des Alkoholes.

Einige interessante Beobachtungen anderer Forscher über Osmiumsäure, die auf alkalische resp. saure Reaktion hinweisen, mögen noch angeführt sein.

Flemming (V, p. 71) sagt, dass man an *Kernen, die mit Osmiumsäure* (0,5-proc.) behandelt waren, selten mehr, meistens aber noch weniger von den Gerüsten sieht, wie an frischem Gewebe. Hier und ebenso in einem anderen Beispiel (I, p. 141, Taf. II b, Fig. 29 a. b. c, frische Kiemenblätter der Salamanderlarve) hat Flemming unmittelbar unter dem Mikroskop die Osmiumsäure zugesetzt und ohne nachherige Alkoholbehandlung den Erfolg studirt. Die Osmiumsäure gab nur sehr geringe, intranucleäre Gerüste (I, Taf. II b, Fig. 29 b), während die Chromsäure (I, Taf. II b, Fig. 29 a) ein sehr reiches Gerüstwerk hervortreten liess. Flemming ist geneigt, auch dieses letztere für natürlich zu halten, während es doch sehr wahrscheinlich ist, dass nur die verschiedene Fällungskraft der angewendeten Reagentien gegenüber dem alkalischen Kern zum Ausdruck gekommen ist. Die Osmiumsäure vermag eben hier nichts auszufällen, und so erscheint der Kern nicht anders als im Leben.

An anderer Stelle gibt Flemming (I, p. 52) selbst an, dass durch Osmiumsäure im Protoplasma von Leberzellen und Eiern feinglänzende Gerinnungen hervorgerufen worden seien. Ob hier die Zellkörper sauer reagirten oder durch die nachträgliche Behandlung noch Aenderungen eingetreten sein könnten, ist nicht zu ersehen.

Dagegen könnte eine ursprünglich saure Reaction des Kernes folgender Mittheilung Flemming's (XI, p. 163, Anmerk. 4) zu Grunde liegen. In Kernen von Säugethier-Ovarialeiern waren nach Osmiumwirkung ausser den Nucleolen auch ausnahmsweise die Gerüste sichtbar, und an solchen Kernen hatte auch Kaliumbichromat nicht so schädigend gewirkt wie sonst, d. h. doch wohl, auch dieses Reagens liess Gerüste erkennen. Da Bichromat ebenfalls nur in sauren Lösungen fällt, so scheinen hier wirklich „saure" Kerne vorgelegen zu haben.

Ferner hat Flemming (I, p. 51, Fig. A) sehr starke Osmiumausfällungen aus dem Zellsaft von Spirogyren beschrieben, die aber durch andere Reagentien, wie verdünnte Essigsäure, Jodlösung, chromsaures Kali, Chromsäure und Pikrinsäure nicht hervorzurufen waren. Hieraus folgt sofort, dass hier kein Proteinstoff ausgefällt wurde, sondern ein weiterer Untersuchung noch zu unterwerfender Körper, der von Loew (I, p. 101) als labiles Protein aufgefasst wird.

Auch Löwit (I, p. 223) hat die Wirkung der Osmiumsäure auf Krebsblutzellen ohne nachherige Alkoholbehandlung verfolgt und festgestellt, dass die Osmiumsäure die Kernstructur, abgesehen von der durch sie bewirkten Quellung des Kernes, in derselben Weise fixirt, wie man sie an den frischen Zellen beobachten kann. Nur die Osmiumsäure wirkte so, durch alle anderen Fixirungsmittel (Flemming'sche Flüssigkeit, Pikrinsäure, Chromsäure) sah Löwit (I, p. 228) körnige Gerinnungen erscheinen. Hier ist wohl wieder nur die eine Annahme berechtigt, dass die Kerne alkalisch sind und so der Omiumsäure gegenüber widerstandsfähig. Das geht auch aus einer Bemerkung Löwit's (I, p. 229) hervor, dass durch Einwirkung von Alkohol auf die mit Osmiumsäure fixirten Zellen Granulirungen im Kerninnern auftreten. Hier liegt ein schönes Beispiel zu den obigen Bemerkungen über die Alkoholhärtung von Osmium-Objecten vor.

O. Hertwig hat an vielen Stellen die Wirkung der Osmiumsäure besprochen. So sagt er (I, p. 383), dass die Osmiumsäure eine „momentane Gerinnung des Eiweisses" herbeiführe und dadurch die einzelnen Formen fast vollständig so wie im lebenden Zustande erhalte (Eier von Toxopneustes). Wenn die Eier saure Reaction hatten, dann war allerdings eine momentane Gerinnung möglich, im anderen Falle wäre wohl eine andere Deutung nöthig. An anderer Stelle (IV, p. 338) heisst es, dass junge Froscheier durch reine Osmiumsäure (0,3-proc.) vollständig homogen durchsichtig gerinnen, aber die Konturen der Kerne, Nucleolen und anderer Körper ziemlich undeutlich zeigen. Alles dies trete aber sofort scharf hervor durch den Zusatz einer stark verdünnten Essigsäure (0,1-proc.). Wiederum würde hier die Erklärung zu lauten haben, dass nach der Säuerung des Objectes die Osmiumsäure erst recht wirken kann und durch Gerinnung alles verdeutlichen. Man kann die Osmiumsäure geradezu als ein Reagens auf die chemische Reaction einer Zelle oder ihres Kernes benutzen. Entstehen nämlich nur durch saure Fixirungsmittel Fäll-

ungen, durch Osmiumsäure und Kaliumbichromat aber nicht, so lag alkalische Reaction vor.

Veer Eecke (I, p. 77) bemerkt, dass in den Zellen des Hundepankreas durch Flemming'sche oder Hermann'sche Mischung ein schönes Netzwerk zwischen den Zymogenkörnern sichtbar werde, während reine Osmiumsäure die entsprechenden Zonen der Zellen homogen erscheinen lässt. Es dürfte hier in den alkalischen Pankreaszellen die Osmiumsäure unwirksam geblieben sein.

Auch auf alkalische Reaction, in diesem Falle des Blutes, ist die Beobachtung Biondi's zurückzuführen, dass ein Tropfen Blut in 5 ccm einer Osmiumlösung (2-proc.) vollkommen klar bleibt. Wenn Biondi (I, p. 104) hieraus folgert, dass die Osmiumsäure das beste Fixirungsmittel für Blut sei, weil es die Eiweisskörper des Plasmas nicht niederschlägt, wie die meisten anderen Fixirungsmittel, so übersieht er die alkalische Reaction. Sollte in gewissen Zellen des Blutes schwach saure Reaction herrschen, so würde in diesen die Osmiumsäure ebenfalls Niederschläge erzeugen.

Man vergleiche auch den Artikel Essigsäure und die Osmiumgemische.

2. Kaliumbichromat.

Schliesst sich eng der Osmiumsäure an, unterscheidet sich von ihr nur durch sein Verhalten gegen Nucleoalbumine, Casein und Conglutin, die aus sauren Lösungen leicht gefällt werden. Unter keiner Bedingung werden niedergeschlagen: Pepton, Nuclein und Nucleinsäure; aus alkalischen Lösungen werden nicht gefällt: Deutero- und Protalbumose, Albumine, Globuline, Nucleoalbumin (Casein und Conglutin), die alle beim Ansäuern sofort ausfallen, selbst nachdem die alkalischen Lösungen mit dem Bichromat wochenlang klar geblieben sind. Hämoglobin gibt sowohl in alkalischen als neutralen Lösungen reichliche Fällungen.

Alle von Kaliumbichromat erzeugten Niederschläge sind in Wasser vollkommen unlöslich.

Seltener wird dieses Salz allein als Fixirungsmittel verwendet, häufig mit Glaubersalz vermengt, als sog. Müller'sche Lösung, die man oft wochenlang wirken lässt. Das Glaubersalz selbst hat keine fällenden Eigenschaften und wirkt wohl eher durch seine Dissociation und eine langsame Abspaltung von Chromsäure, woraus sich die anerkannt langsame, aber doch sichere Wirkung des Gemisches erklären könnte. In der kurzen Zeit unserer Fällungsversuche unterschied sich die Müller'sche Lösung von reiner Chromatlösung gar nicht, abgesehen gegenüber dem Hämoglobin (siehe dort).

Sehr ausführlich hat sich Flemming mit der Wirkung der chromsauren Salze auf thierische Zellen beschäftigt. Nach ihm (I, p. 34) ist das Kaliumbichromat ein gutes Fixirungsmittel für das Säugethierei, viel besser als Pikrinsäure und Chromsäure und merkwürdig besser als für die Kerne der meisten anderen Zellenarten. Im Uebrigen freilich ist Flemming auf das Bichromat nicht gut zu sprechen, an zahlreichen, hier nicht ausführlich zu referirenden Stellen (I, p. 108, 109, 145, 153; VI, p. 352; VII, p. 334—338; VIII) hat er in lebhafter Weise sich gegen dieses Salz und die chromsauren Salze überhaupt ausgesprochen. Sie sollen (I, p. 108) die ursprüngliche

Kernstructur theilweise zerstören „unter Lösung oder Quellung der präformirten Gerüstbalken und Wiedergerinnung der so gelösten oder gequollenen Substanz in gleichmässiger Netzform", freilich sollen diese von Flemming geradezu Chromsalznetze genannten Artefacte unter „Anlehnung an die Lage der ursprünglichen Gerüstbalken" sich bilden. Ferner treten nach Flemming (I, p. 108, 145) die Nucleolen in Chromsalzpräparaten meistens nicht hervor.

Auch die Kerntheilungsfiguren (Flemming I, p. 109) werden durch Kaliumbichromat stark verändert. Für alle Studien über feineren Bau des Kernes und des Protoplasmas sind nach Flemming die chromsauren Salze ganz untauglich.

Auf ähnliche Beobachtungen anderer Forscher braucht wohl nicht näher eingegangen zu werden.

Nur auf eine Mittheilung Merk's (I, p. 121) sei kurz hingewiesen. Er erwähnt, dass die durch Müller'sche Lösung hervorgerufenen Aenderungen sich so langsam vollziehen, dass man sie nicht „continuirlich bis zur Beendigung unter dem Mikroskop verfolgen kann". Nach dem oben Mitgetheilten über den Einfluss der chemischen Reaction ist diese Bemerkung leicht erklärlich. Merk's Object (Schleimzellen) reagirte sicher neutral oder schwach alkalisch.

Für die Nachbehandlung der mit Bichromat oder Müller'scher Lösung fixirten und ausgewaschenen Stücke mit Alkohol gilt das bei der Osmiumsäure ausführlich Besprochene ebenfalls. Auch die Reaction der Gewebe wirkt wie dort. Andere Bichromate, wie das zuweilen benutzte Ammonsalz, habe ich nicht untersucht, weil andere Resultate nicht zu erwarten waren.

3. Altmann's Gemisch

(Kaliumbichromat 2,5 Proc., Osmiumsäure 1 Proc.).

Von der durch zahlreiche Beobachtungen gestützten Erfahrung ausgehend, dass saure Fixirungsmittel im weitesten Sinne (Altmann I, p. 44, 45) unnatürliche Structurbilder im Kern und Protoplasma hervorrufen, setzte Altmann sein „neutrales" Gemisch zusammen, dem er (I, p. 45) „die vielseitigste und zuverlässigste Wirkung", die man von einer Fixirung erwarten kann, zuschreibt. Er verlangt besonders (I, p. 34), dass das Gemisch keine freie Chromsäure oder andere freie Säure enthalte, sondern streng „neutral" sei. Mit diesem Gemisch versuchte Altmann in allen Organen Granula als Elementarorgane nachzuweisen und wurde so zu einem eifrigen Förderer und Mitbegründer der Granulatheorie, über die in einem späteren Abschnitt zu sprechen sein wird.

Ueber die Fällungskraft und die daraus abzuleitende Zuverlässigkeit der Mischung gibt folgende Uebersicht (Tabelle S. 17) Auskunft (0 bedeutet keine Fällung innerhalb 1—2 Tagen, + sofort reichlichen Niederschlag).

Wie aus den Eigenschaften ihrer Componenten bereits zu erwarten war, so verhält sich auch die Mischung alkalischen Eiweisslösungen gegenüber: abgesehen von Hämoglobin, wird keine gefällt. Nuclein und Nucleinsäure werden überhaupt nicht gefällt, die anderen Eiweisskörper nur in saurer Lösung. Besonders sei noch die Wirkung auf Nucleoalbumine (Casein und Conglutin) hervorgehoben. Wie die

Fixirungs-mittel	Reaction der Eiweiss-lösung	Pepton	Deutero-albumose	Primäre Albumose	Serum-albumin	Serum-globulin	Casein (Con-glutin)	Nuclein	Nuclein-säure	Hämo-globin
ALTMANN's Gemisch	alkalisch	0	0	0	0	0	0	0	0	+
	sauer	+	+	+	+	+	+	0	0	+
1-proc. Osmium	alkalisch	0	0	0	0	0	0	0	0	+ langsam
	sauer	+	+	+	+	+	0	0	0	+ langsam
2,5-proc. Kalium-bichromat	alkalisch	0	0	0	0	0	0	0	0	+
	sauer	0	+	+	+	+	+	0	0	+

Tabelle zeigt, fällt nur eine Componente der Mischung, das Chromat, diese Körper aus sauren Lösungen, die Osmiumsäure ist ganz wirkungslos.

In alkalischen oder neutralen Gewebsstücken kann, nach der Tabelle, das Gemisch, abgesehen mit Hämoglobin, keine Artefacte erzeugen, das ist zuzugeben. Aber die Frage scheint berechtigt, kann es bei alkalischer Reaction überhaupt fixiren, denn dieser Vorgang beruht doch, wie ALTMANN (III, p. 230) selbst hervorhebt, auf den Eiweiss fällenden Eigenschaften der Fixirungsmittel. Wenn die geformten Theile des alkalischen Protoplasmas und Kernes aus irgend einem Eiweisskörper obiger Tabelle oder aus Mischungen davon bestehen und zur dauernden Fixirung noch einer Fällung bedürfen, dann kann sie ALTMANN's Gemisch nicht conserviren. Es greift vielmehr die schon bei der Osmiumsäure besprochene Wirkung des Entwässerungsalkoholes ein und besorgt vielleicht die Hauptarbeit.

Saure Gewebe und Zellen werden dagegen von ALTMANN's Gemisch sogleich „fixirt", die Möglichkeit, dass gelöste Eiweisskörper des Zell- und Kernsaftes ausgefällt werden, ist aber dann genau so gross wie bei sauren Fixirungsmitteln. Die chemische Reaction der zu fixirenden Objecte ist also zuerst festzustellen, wenn man ein Urtheil darüber gewinnen will, ob ALTMANN's Granula wirklich ursprüngliche morphologische Elemente der Zelle sind oder nur Ausfällungen. Hier sei nur erwähnt, dass saure Reaction für viele Organe des thierischen Körpers angegeben wird und dass alkalische Gewebsstücke sehr bald post mortem nachsäuern. Näheres vergl. Kapitel V. Dort wird auch die andere Frage zu beantworten sein, ob granulabildende Eiweisskörper in thierischen Geweben verbreitet sind und in solcher Quantität vorkommen, dass sie mit ALTMANN's Gemisch Granula erzeugen können.

4. Jodkaliumquecksilberjodid.

Bis jetzt nur von ALTMANN (I, p. 32) mit schwankendem Erfolg zum Nachweis der Zellgranula benutzt. Das Mittel fällt Deuteroalbumose und Serumalbumin nur in saurer Lösung, der Niederschlag ist in Wasser unlöslich. Auf andere Eiweisskörper wurden die Versuche nicht ausgedehnt. Nach den Angaben der physiologischen Chemie ist im Ganzen ein ähnliches Verhalten zu erwarten, wie von den anderen soeben behandelten „neutralen" Fixirungsmitteln.

III. Gruppe. Nucleinsäure, Deuteroalbumose und Serumalbumin werden bei jeder Reaction gefällt.

Der fällungsverzögernde Einfluss der alkalischen Reaction ist auch bei dieser Gruppe noch mehr oder weniger bemerkbar. Einige hierher gehörige Stoffe allerdings, wie Sublimat (concentrirt wässrig), Flemming's und Hermann'sche Mischung, fällen gleich gut schwach alkalische, neutrale und saure Lösungen. Beim absoluten Alkohol hemmt die alkalische Reaction fast gar nicht, stärker aber bei 96-proc., worüber man die folgende Besprechung des Alkoholes vergleichen wolle. Aehnliche Beispiele dafür, dass eine etwas höhere Concentration des Fixirungsmittels erforderlich ist, um alkalische Lösungen ebenso schnell und vollständig auszufällen wie saure, würden auch Pikrinsäure, Chromsäure, Formaldehyd liefern können. Den Charakter der ganzen Gruppe bestimmt man wohl am besten dahin, dass alle hierher eingeordneten Stoffe in der zu Fixirungszwecken eingebürgerten Concentration und in der zur Fixirung üblichen Zeit (30 Min.—20 Stunden) die Fällungsverzögerung durch eine schwach alkalische Reaction vollkommen überwinden. Das ist besonders hervorzuheben, weil nach den Angaben der physiologischen Chemie für die Fällung des Eiweisses durch Pikrinsäure (auch Gerbsäure) schwach saure Reaction zwar nothwendig zu sein scheint, aber doch bei geeigneter Concentration nicht ist.

Nach der Löslichkeit der Niederschläge mit Nucleinsäure und Deuteroalbumose ordnen wir die Fixirungsmittel in zwei Untergruppen.

1. Untergruppe. Die Fällungen der Nucleinsäure und der Deuteroalbumose sind in Wasser löslich, Albumin wird coagulirt.

1. Alkohol.

Alkohol, 96-proc. und absolut, werden, bei öfterer Erneuerung, annähernd als gleich präcise Fixirungsmittel geschätzt. In den Fällungsversuchen mit Lösungen tritt natürlich infolge der Verdünnung der 96-proc. Alkohol etwas hinter dem absoluten zurück, besonders bei alkalischer Reaction, die eine viel grössere Menge Alkohol bis zum Erscheinen des Niederschlages verlangt, der zunächst nur als schwache Opalescenz sich bemerkbar macht. Rechnet man diese leicht erklärliche Verzögerung ab, so ergibt sich, dass 96-proc. und absoluter Alkohol alle Lösungen folgender Eiweisskörper fällen: Peptone, alle Albumosen, Albumine, Globuline, Nucleoalbumine, Hämoglobin, Nuclein und Nucleinsäure. In Wasser lösen sich leicht die Niederschläge der Peptone, Albumosen und Nucleinsäure, sie werden auch durch wochenlange Wirkung des Alkoholes nicht coagulirt. Schon am 1. Tage werden alle anderen aber in Wasser unlöslich.

Auch stärkere Verdünnungen des Alkoholes (48-, 24-proc.) rufen noch in den Hollundermarkversuchen deutliche Niederschläge hervor, und hier zeigt sich dann auch der 96-proc. Alkohol der alkalischen Reaction vollkommen gewachsen.

Auf die Nachfixirung durch den Einbettungsalkohol wurde bereits p. 12 hingewiesen.

Der Alkohol wird infolge seiner grossen allseitigen Fällungskraft und der Coagulirung der meisten Eiweisskörper wohl geeignet sein.

dauerhafte Artefacte zu liefern, während er andererseits vollkommen untauglich ist, aus Albumosen und Nucleinsäure bestehende, im Leben noch ganz oder halb gelöste Bestandtheile der Zelle in den Präparaten zu erhalten.

A. Zimmermann (III, p. 10) sah in den Leukoplasten der Pflanzen durch Alkohol ein Artefact, eine körnige Ausfällung entstehen.

Im Zellsaft sind gerüstartige Ausfällungen durch Alkohol z. B. von Berthold (I, p. 62) bei den Brennhaaren von Urtica, von F. Schwarz (I, p. 151) bei verschiedenen Pflanzenzellen beschrieben. Da bei vielen davon durch Sublimat, Pikrinsäure, Salpetersäure und Silbernitrat kein Niederschlag entstand, so folgert Schwarz mit Recht, dass hier kein Eiweisskörper vorgelegen haben konnte. Das Gleiche wurde schon oben für die Os-Fällung in Spirogyrafäden hervorgehoben.

Flemming (I, p. 107, 125) hat in Kernen und in Protoplasmakörpern nach Alkoholfixirung Bilder vorgefunden, die er geneigt ist nicht für ursprünglich zu halten. Auch O. Hertwig (II, p. 40) konnte bei thierischen Eiern ein intranucleäres Netz nicht erkennen und möchte dies auf Rechnung des Alkoholes setzen, „durch welchen eine mehr gleichmässige Gerinnung des gesammten Inhaltes der Keimbläschen herbeigeführt wird".

Gruber (I, p. 123) bemerkt, dass durch absoluten Alkohol in den Kernen von Rhizopoden Kügelchen sichtbar werden, die nicht für „präformirte körnige Bestandtheile der chromatischen Substanz" gehalten werden dürfen, sondern ein Niederschlag durch das Reagens sind.

Sehr wichtig sind endlich die Beobachtungen von Hans Held (I, p. 407; II, p. 201), dass die sog. Nissl-Körper der Nervenzellen, zu deren Verdeutlichung Nissl den Alkohol empfohlen hatte, nicht präformirte Gebilde, Elementarorgane sind, sondern höchst wahrscheinlich durch den Alkohol in Granulaform ausgefällte Stoffe.

2. Aceton.

Aceton wurde von Held (II, p. 215) zur Herstellung einer alkoholfreien Sublimatlösung benutzt und könnte vielleicht weiteren Eingang in die Histologie finden. Es hat dieselben Fällungseigenschaften wie der Alkohol. Wasserlöslich werden abgeschieden Pepton, Deuteroalbumose und Nucleinsäure, dagegen scheint die Protalbumose coagulirt zu werden, was sicher mit Serumalbumin, Casein, Hämoglobin geschieht.

3. Pikrinsäure (wässrige, alkoholische Lösung, Pikrinschwefelsäure).

Wässrige Pikrinsäure (0,5-proc.) und Kleinenberg's-Pikrinschwefelsäure verhalten sich vollkommen gleich; einige Versuche mit alkoholischer Lösung zeigten, wie von vornherein zu erwarten war, dass auch sie keine abweichenden Eigenschaften besitzt. Mit Pikrinessig- und Pikrinsalpetersäure wurden keine Versuche angestellt, jedoch lässt die Combination vermuthen, dass wesentliche Differenzen gegenüber der wässrigen Lösung nicht vorkommen werden, da der Zusatz von Salpetersäure ein sehr geringer ist (2—3 Volumprocent), der höhere Gehalt (25 Volum) an Essigsäure aber wohl kaum ausreichen dürfte, die durch Pikrinsäure erzeugten Fällungen zu lösen.

Der Pikrinsäure sind folgende Eigenschaften zuzuschreiben: Peptone und Albumosen werden reichlich aus jeder beliebig reagirenden Lösung

gefällt. Die Niederschläge sind in Wasser leicht löslich, verschwinden schon während des Auswaschens. Die anderen Eiweisskörper (Albumine, Globuline, Nucleoalbumine, Nuclein, Hämoglobin) werden aus jeder Lösung schnell gefällt, aus saurer vielleicht nur wenig schneller als aus alkalischer. Die Niederschläge sind in Wasser unlöslich, nur bei sehr langem Stehen unter Wasser (8—10 Tage) wird eine schwache Abnahme bemerkbar. Für Fixirungszwecke sind die Niederschläge jedenfalls als unlöslich zu betrachten. Sehr leicht lösen sie sich aber in verdünnter Kalilauge (0,2-proc.), was vielleicht für eine Nachbehandlung der Schnitte später einmal verwendet werden könnte. Nucleinsäure wird nur durch grosse Mengen ausgefällt, bleibt aber in Wasser löslich.

Eine merkwürdige Uebereinstimmung weisen folgende drei Mittheilungen auf, dass durch Pikrinsäure der Kernsaft fein granulär gerinnt. Die eine Angabe (Boveri II, p. 35) bezieht auf Ascariseier, die zweite (Löwit IV) auf Krebsblutkörperchen, die dritte (Lidforss I, p. 9) auf Embryosackkerne der Tulpe, in denen merkwürdiger Weise Chromsäurefixirung keine solche Fällung hervorruft. Löwit hielt die feinkörnige Granulirung für ein Kunstproduct, das in viel verdünnterer Pikrinsäure (auf 100 Wasser 2 vol. kalt gesättigte Lösung) ausbleibe. Vielleicht liegt hier eine Wirkung der alkalischen Reaction vor, die stärkere Concentration zur Erzeugung der Niederschläge verlangt. Auch Boveri (II, p. 35), der mit Pikrinessigsäure arbeitete und die Ausscheidung als „leicht granulirt oder besser gesagt flockig“ beschreibt, hält sie für eine durch die Säure hervorgerufene Gerinnung des „Kernsaftes“. An Alkoholmaterial war der Kernsaft „homogen und wasserhell“. Sehr intensive Ausscheidung, durch die die Objecte ganz undurchsichtig wurden, beobachtete Strasburger (I, p. 142) an Pollenkörnern von Allium, auf die Chromsäure ebenso wirkte.

2. Untergruppe. Alle Fällungen sind in Wasser unlöslich.

Diese letzte Gruppe, zu der einige der beliebtesten Fixirungsmittel zu zählen sind, ist besonders geeignet, Artefacte aller Art, granuläre und gerinnselig-gerüstige, zu erzeugen, weil nicht nur, einige vereinzelte Ausnahmen abgerechnet, Albumine, Globuline, Nucleinkörper und Hämoglobin unlöslich gefällt werden, sondern auch die Albumosen und das Pepton, das letztere freilich nur von einigen Mitteln. Wenn überhaupt bei beliebiger Reaction Eiweisskörper im Protoplasma oder im Kern gelöst vorkommen und ihre Menge nicht unter das Fällungsminimum, was sehr gering ist, herabsinkt, dann müssen sie durch die nun folgenden Fixirungsmittel derartig dauerhaft und unlöslich abgeschieden werden, dass sie im fertigen Präparat auch hervortreten.

1. Gerbsäure.

Obgleich das Tannin ein ausgezeichnetes Fällungsmittel ist, hat es doch in der Fixirungstechnik noch keine Verwendung gefunden. Sicher deshalb, weil es dem Verschimmeln sehr ausgesetzt ist und die Gewebsstücke nicht aseptisch machen kann, was doch bei der Fixirung

eine sehr grosse Rolle spielt. Auch nebenbei ist es nur selten gebraucht worden. ZACHARIAS (III, p. 654) konnte damit in Kernen aus Phajusknollen eine netzförmige Structur der sogenannten Zwischensubstanz, die ungefähr dem Kernsaft entspricht, hervorrufen. Jedenfalls ein Gerinnungsproduct. ALTMANN (I, p. 32) erhielt mit Tannin gelegentlich gute Granulabilder. Eine andere Anwendung des Tannins empfiehlt RAWITZ (I, p. 76) zur Erzielung der von ihm sehr angepriesenen adjectiven Färbung, die sich später als Folge einer harmlosen Verstopfung entpuppen wird.

Das Tannin (2-proc.) fällt alle Albumosen und auch das Pepton sofort und äusserst vollständig aus basischen und sauren Lösungen. Die Niederschläge sind in kaltem Wasser fast ganz unlöslich, aber doch nicht ganz. Jedenfalls würden sie dem üblichen Auswaschen und der übrigen Behandlung bei der Präparatherstellung ohne Verminderung widerstehen. Man würde nur wegen partieller Lösung häufiger auf Ringgranula stossen. Es wurden noch untersucht Serumalbin, Casein, Nuclein, die bei jeder Reaction sofort dick gefällt und vollkommen unlöslich werden.

Nach eigenen Erfahrungen an Wurzeln von Vicia Faba und an der Magen- und Darmwand des Hundes kann ich Tannin nicht als Fixirungsmittel empfehlen, das man sans façon mit Erfolg anwenden könnte.

2. Chromsäure.

Das Chromsäureanhydrit (Chromtrioxyd) ist in Wirklichkeit keine Säure und wird auch in der wässrigen Lösung nicht zur Säure, etwa wie Schwefelsäureanhydrit; in histologischem Sinne kann es nur als schwache Säure behandelt werden, was sich besonders auch darin äussert, dass seine Fällungskraft durch schwach alkalische Reaction etwas herabgedrückt, aber nicht gänzlich aufgehoben wird, wie bei den sogenannten neutralen Fixirungsmitteln. Zweifellos besitzt die Chromsäure eine hohe und vielseitige Fällungskraft in rein wässriger Lösung, die vielleicht durch geringe Mengen von Schwefelsäure, die von der Bereitung der Chromsäure in dem käuflichen Product zurückgeblieben sind, gegenüber alkalischen Eiweisslösungen noch erhöht wird. Der Zusatz von Ameisensäure (RABL) oder Essigsäure (FLEMMING, LOBIANCO) wirkt sicher in demselben Sinne, ohne im Uebrigen die fällenden Eigenschaften des Reagens zu verändern.

Echte Peptone werden von Chromsäure (0,5-proc.) nicht gefällt (KÜHNE III und CHITTENDEN, p. 450), jedoch wird man bei Controlversuchen stets mit geringen Verunreinigungen durch Albumose zu rechnen haben, die einen geringen Bodensatz erzeugen würden. In wasserunlöslicher Form werden aus alkalischen, neutralen und sauren Lösungen gefällt: Albumosen, Albumine und Globuline, Nucleoalbumin, Nuclein und Nucleinsäure, Hämoglobin.

Bei dieser grossen Fällungskraft ist es erklärlich, dass in der Literatur zahlreiche Klagen und Zweifel über die Zuverlässigkeit der Chromsäure laut geworden sind.

So sagt O. HERTWIG (I, p. 411): „Im Allgemeinen ist man bei Chromsäurepräparaten leicht Täuschungen ausgesetzt. So behalten z. B. nach Einwirkung des Reagens die Furchungskerne und die Tochterkerne, solange sie die ruhende Gestalt besitzen, ihre morphologische Beschaffenheit nicht bei. Denn während sie in frischem Zu-

stand ganz homogen aussehen und auch in Osmiumsäure gleichmässig gerinnen (NB. alkalische Reaction!), werden dagegen durch die Chromsäure körnige Niederschläge in ihnen hervorgerufen, welche man nicht etwa für Nucleoli halten darf (Fig. 28 f.)."

Flemming (II, p. 446) hebt hervor, dass „die Fixirung mit Chromsäure überhaupt keine hinreichende Garantie bietet, ob man das, was sie zeigt, für rein präformirt nehmen kann". Eine ähnliche Aeusserung auch später (III, p. 704 Anmerk.), wonach die Chromsäurefixirungen der Natur nicht näher stehen sollen als die durch Osmium. Ferner hat Flemming an zahlreichen Stellen seines Buches über die Zelle (I, p. 34, 39, Taf. I, Fig. 18, p. 125, 133, 141, 215) über Wirkungen von Chromsäure berichtet, die wohl auch zur Genüge zeigen, wie oft Fällungen entstehen. Sehr lehrreich ist der auf p. 141, Tafel II b, Fig. 29 a—c beschriebene Fall von Zellkernen aus den Kiemenblättern einer Salamanderlarve. Der mit Chromsäure fixirte Kern (Fig. 29 a) enthält ein reiches Gerüstwerk, während der mit Osmiumsäure fixirte Kern nur ein im Vergleich zum Chromsäurebild sehr dürftiges Gerüst enthält. Welches Bild entspricht wohl am meisten der Natur?

Merk (I, p. 114) hält die im Chromsäurepräparat von Becherzellen oder bei Flemming'scher Mischung sichtbare Filarmasse des Plasmas für ein Product der Chromsäure. Kultschitzky (I, p. 346) sagt, dass Chromsäure und alle Mischungen damit infolge gewebeähnlicher Niederschläge mit Eiweiss der Natur nicht entsprechende Bilder liefert.

Chromsäure und molybdänsaures Ammon. Altmann (III, p. 224) benutzte eine Mischung, die 2,5 Proc. molybdänsaures Ammon und 0,25 Proc. Chromsäure enthielt, um die Granula des ruhenden Kernes nachzuweisen, die er auch später (I, Taf. XXXII) abbildete. Er glaubt die Thatsache, dass dieselben Fixirungsmittel, welche den Zellenkörper und den sich theilenden Kern so gut conserviren, den ruhenden Kern „mehr zerstören als fixiren", auf dessen chemische Eigenschaften zurückführen zu sollen. Und zwar glaubt Altmann, „dass der ruhende Kern vielleicht eiweissfrei" ist. Gleichwohl hatte er mit obigem Gemisch, das doch durch seinen Gehalt an Chromsäure ein sicheres Fällungsmittel für Eiweiss ist, guten Erfolg, der Kern bestand jetzt aus einem Haufen gut färbbarer Körnchen. Es dürfte also obige Speculation Altmann's über die Eiweissfreiheit des ruhenden Kernes nicht zutreffen. Wenn die Mischung mehr Chromsäure, 0,5—1 Proc., enthielt, dann erschienen im Kerne „jene groben Balkennetze der Autoren mit ihren weiten leeren Zwischenräumen". Altmann bezeichnet seine neue Methode als noch sehr difficil und weiterer Ausbildung bedürftig. So viel steht aber fest, dass auch diese Mischung ein gutes Fällungsmittel für Eiweisskörper ist.

3. Sublimat.

Sublimat in wässriger Lösung (0,5-, 1-, 7-proc.) fällt echte Peptone nach Kühne (I, p. 313) schwächer als Tannin oder Jodkaliumquecksilberjodid, nach Neumeister (II, p. 346, III, p. 189) aus neutralen Lösungen mehr oder weniger vollständig. Bei meinen Versuchen erzeugte 1 Proc. Sublimat in sauren und schwach alkalischen Lösungen des Peptones sofort eine deutliche Opalescenz, als Zeichen der beginnenden Fällung, die sich innerhalb 20 Stunden als kräftiger Nieder-

schlag absetzte, aber doch nicht ganz vollkommen zu sein schien. Sie war unlöslich in Wasser, ebenso wie die der Deutero- und Protalbumose. Wie diese, werden auch Albumine, Globulin, Casein und Conglutin, Hämoglobin, Nuclein und Nucleinsäure aus alkalischer und saurer Lösung unlöslich ausgefällt. Sehr langsam erscheinen die Fällungen in den zunächst nur opalescirenden Lösungen von Casein und Conglutin, Nuclein und Nucleinsäure. Die concentrirte wässrige Sublimatlösung (circa 7-proc.) ist gegen schwach alkalische Reaction nicht merklich empfindlich und wird dadurch nicht in der Fällungskraft geschwächt, geringere Lösungen aber (0,5- und 1-proc.) können doch deutlich beeinflusst werden. Deshalb wohl hat die Empirie der Fixirung entweder die concentrirte Lösung, oft sogar heiss, angewendet oder Essigsäure als Säurer beigegeben. Auch die alkoholische Lösung besitzt alkalischen Eiweisslösungen gegenüber gesteigerte Fällungskraft.

Alle Sublimatfällungen sind in Wasser ganz unlöslich und werden auch von 0,2 Proc. Kali nicht schnell und glatt weggenommen, wohl aber von einer 2-proc. Jodkaliumlösung, die vielleicht zur Reinigung von Sublimatschnitten empfohlen werden kann und dazu jedenfalls tauglicher ist als Jodtinctur. Deuteroalbumose, durch Sublimat (1-proc. alkoholisch oder 5-proc. wässrig) gefällt, ist in Jodalkohol keineswegs löslich und wird auch durch kurzes Ueberspülen damit nicht wasserlöslich. Jodkalium dagegen wirkt momentan und vollständig, es löst fast augenblicklich die Sublimatfällungen von Albumose, Nucleinsäure, Serumalbumin, Globulin, Casein, Hämoglobin. Auf einige Nachtheile der Jodtincturnachbehandlung paraffinirter Objecte, die durch die Herauslösung der Sublimatkrystalle leiden und stellenweise klaffende Risse und Löcher bekommen, hat vor Kurzem SCHAPER (I, p. 471) hingewiesen. Er hebt ferner auch hervor (I, p. 464), dass die Jodtinctur oft lange einwirken muss, um die Sublimatfällungen der Eiweisskörper sowohl, als auch die Krystalle herauszulösen, und dass dadurch Störungen des mikroskopischen Bildes und auch der Färbkraft eingeleitet werden. Es würde sich wohl empfehlen, an Stelle der Jodtinctur das auf Fällungen viel schneller wirkende Jodkalium zu versuchen. Sublimatfixirung, mit oder ohne Jodtincturbehandlung, kann jedenfalls sehr zahlreiche Artefacte herbeiführen, was hier entgegen M. HEIDENHAIN, der ein begeisterter Lobredner des Sublimates ist, hervorgehoben werden mag. Jedenfalls genügt die Beweisführung, die M. HEIDENHAIN (II, p. 126, I) für die Realität seiner Lanthaninkörnchen ins Feld führt, nicht, um alle Zweifel zu beseitigen. Denn wenn HEIDENHAIN (II, p. 126) aus dem Umstande, dass „nirgends in den Geweben geronnene structurlose Eiweisskörper auffällig sichtbar werden“, schliesst, dass auch die von ihm als Lanthanin bezeichnete, körnige Substanz im Kern kein einfaches Fällungsproduct sein kann, so entgeht ihm, dass die Eiweisskörper durch Sublimat (und andere Fixirungsmittel) keineswegs „structurlos“ gerinnen, sondern bald in schönster Granulaform, bald gerüstig-gerinnslig und stets schön färbbar abgeschieden werden. A. ZIMMERMANN (IV, p. 43) hält es noch nicht mit voller Sicherheit erwiesen, ob das Lanthanin nicht etwa ein Kunstproduct ist.

4. Platinchlorid.

Peptone werden von Platinchlorid (5 Proc.) nach KÜHNE (III, und CHITTENDEN, p. 450) bei eben bemerkbarer alkalischer Reaction nur sehr

unvollkommen gefällt, nur schwach getrübt. Ich fand, dass alle Lösungen nur langsam sich trüben und innerhalb 20 Stunden einen mittleren Niederschlag geben, der noch weit geringer ist als beim Sublimat, mit dem im Uebrigen das Platinchlorid ganz übereinstimmt. Es fällt alle andern Eiweisskörper bei saurer, neutraler und schwach alkalischer Reaction.

Reine Platinchloridlösung wird wohl wenig angewendet, während es als Bestandtheil der später zu besprechenden Hermann'schen Mischung eine grosse Rolle spielt. Löwit (III, p. 529—532) beobachtete, dass in den Kernen aller Krebsblutzellen durch längere Wirkung dünnerer (0,1—0,3-proc.) oder durch kürzere Wirkung stärkerer (0,5—1-proc.) Platinchloridlösungen „Fadenstructuren" hervortreten, die er für Kunstproducte hält.

Merkel'sche Mischung, je 0,125 Proc. Platinchlorid und Chromsäure enthaltend, vereinigt zwar zwei kräftig fällende Mittel, ihre Wirkungen freilich addiren sich nicht, sondern gehen neben einander her. Das stärkere ist entschieden das Platinchlorid, denn 0,125-proc. Chromsäure wird von schwach alkalischer Reaction deutlich gehemmt. Die ganze Mischung ist als eine schwache zu bezeichnen, was auch aus der Bemerkung A. Zimmermann's (I, p. 4) hervorgeht, dass die Fixirung der einzelnen Kernbestandtheile in vielen Fällen eine sehr ungenügende war.

5. Formaldehyd (Formol).

Vom Formol, einer 40-proc. Lösung von Formaldehyd, werden verschiedene Verdünnungen als Fixirungs- und Conservirungsmittel empfohlen, sehr beliebt ist 4-proc., d. h. eine 10-fache Verdünnung des käuflichen Formols, die aber entschieden für Fixirungszwecke zu dünn ist. Denn schwacher alkalischer Reaction gegenüber ist 4-proc. Formaldehyd nahezu machtlos, und selbst in schwach sauren Lösungen bedarf es oft eines grossen Ueberschusses, damit Fällung eintritt. Dagegen dürfte eine 10-proc. Lösung, also das Formol des Handels auf $^1/_4$ verdünnt, geeigneter sein. Pepton wird nicht gefällt, ebenso scheinen Casein und Conglutin sehr schwer niedergeschlagen zu werden. Dass sie vollkommen unfällbar durch Formaldehyd sind, ist unwahrscheinlich, es würde jedenfalls nur höherer Concentration bedürfen. So wurde z. B. in Hollundermarkschnitte injicirte 2-proc. Lösung von Nucleinsäure in 0,2 Ammoniak durch 4-proc. Formaldehyd in 2 Stunden gar nicht gefällt, während 40-proc., also das unverdünnte Formol, sofort einen Niederschlag gab. Deuteroalbumose, Serumalbumin, Hämoglobin werden aus neutraler oder schwach saurer Lösung durch 10 Proc. präcis gefällt.

Das Formaldehyd, selbst 40-proc., hat jedenfalls nur mittlere Fällungskraft und ist wohl mehr wegen seiner antiseptischen Eigenschaften als Conservirungsmittel eingeführt worden. Wird es aber als Fixirungsmittel benutzt, so wird es, wie alle anderen, gelöste Eiweisskörper mehr oder weniger vollständig und unlöslich ausfällen. Nach Blume (I, p. 127) wird durch unverdünntes Formol Hühnereiweiss und auch Serumalbumin in eine beim Erhitzen nicht mehr coagulirende Modification, das Protogen, übergeführt, die aber von Alkohol noch gefällt wird.

6. Jodlösungen (Jodalkohol, LUGOL'sche Lösung).

Um die Fällungskraft des Jodes kennen zu lernen, wurden einige orientirende Versuche mit LUGOL'scher Lösung (100 H_2O, 1 g Jod, 2 g Jodkalium) angestellt, die aber noch nicht ausreichen, ein volles Bild der Jodwirkung zu geben.

Der Reaction gegenüber ist die LUGOL'sche Lösung indifferent; so fällte sie z. B. alkalische Lösungen von Albumosen, Serumglobulin, Serumalbumin, Casein und Conglutin augenblicklich, ebenso neutrale Lösungen von Hämoglobin und Serumalbumin, schwach saure von Serumalbumin, Protalbumose und Deuteroalbumose. Die Niederschläge sind in Wasser unlöslich.

Jodalkohol (50-proc. Alkohol mit circa 1 Proz. Jod) vereinigt die Fällungskraft des verdünnten Alkoholes mit der des Jodes und wird durch dieses besonders alkalischer Reaction gegenüber gestärkt. Es wurde Deutero- und Protalbumose aus saurer und alkalischer Lösung schnell gefällt, ebenso alkalisches Serumalbumin, langsamer alkalische und saure Nucleinsäurelösung, alkalisches Nuclein. Man wird annehmen können, dass auch der Jodalkohol sämmtliche Eiweisskörper fällt und zugleich mehr oder weniger coagulirt. Selbst die Deuteroalbumose-Niederschläge waren in Wasser schwer löslich geworden. Nachtheilig ist die grosse Farbfeindlichkeit des schwer auswaschbaren Jodes.

7. Osmiumessigsäure.

Sie ist nach dem zu beurtheilen, was schon für die beiden Componenten gesagt wurde. Die Essigsäure dient hauptsächlich als Ansäurer für die, alkalischer Reaction gegenüber ohnmächtige Osmiumsäure. Nucleinsäure wird, falls nur schwach angesäuert, gar nicht gefällt und würde bei stärkerem Zusatz nur der Essigsäure, nicht der Osmiumsäure erliegen. Casein und Conglutin werden, wenn nur wenig (0,1—0,2 Proc.) Essigsäure zugesetzt ist, zunächst schwach gefällt und im Ueberschuss theilweise wieder gelöst. Sie sind unzuverlässig. Albumine, Globuline und Hämoglobin, endlich die Albumosen geben in Wasser ganz unlösliche Niederschläge.

8. FLEMMING's Gemisch

(Chromsäure 0,25 Proc., Osmiumsäure 0,1 Proc., Essigsäure 0,1 Proc.).

FLEMMING selbst äussert sich über die Wirkungsweise seines Gemisches folgendermaassen (I, p. 381): „Die treue Fixirung der Formen bei diesem Verfahren ist jedenfalls der momentan tödtenden Wirkung der Osmiumsäure zuzuschreiben, die gleichzeitige Verdeutlichung den anderen mitwirkenden Säuren. Dass bei Anwendung blosser Chromsäure und Pikrinsäure vielfach stärkere Schlängelungen, Knickungen, auch Schrumpfungen der chromatischen Fäden vorkommen, als es offenbar der Natur entspricht, erkläre ich mir daraus, dass diese Säuren langsamer tödten und während des Absterbens noch Spielraum für einige Veränderungen lassen."

Dieser Satz führt sogleich durch die Anwendung der Worte „tödten" und „absterben" auf das Principielle des Fixirungsvorganges. Was versteht FLEMMING hier unter tödten und absterben? Ich

glaube doch nur Aufhebung und Stillstand der gerade in der Zelle verlaufenden, mit morphologischen Veränderungen verbundenen Processe: hervorgerufen durch die Gerinnung alles Gerinnbaren, die chemische Fällung alles Fällbaren. Diese Deutung kann zunächst ganz davon absehen, in welcher Weise vielleicht „das Absterben", d. h. die Gerinnung und Fällung eines Chromosoms oder eines Nucleolus näher vorzustellen wäre. Jedenfalls ist es die Fällungskraft eines Fixirungsmittels, von der das schnellere oder langsamere Absterben der Zellinhalte abhängt. Und diese Fällungskraft selbst wieder kann wesentlich beeinflusst, ja ganz aufgehoben werden durch die chemische Reaction der Zelle. Aber selbst bei günstigster Reaction, schwach sauer, ist die Fällungskraft der verschiedenen Bestandtheile des Gemisches und der Pikrinsäure doch eine andere, als FLEMMING voraussetzt.

Die folgende Tabelle gibt zum Theil nach Versuchen mit Hollundermarkschnitten, die mit den Eiweisslösungen injicirt und nach oberflächlichem Abtupfen zwischen Fliesspapier in die Fixirungsflüssigkeit eingelegt worden waren, den unter dem Mikroskop beobachteten Eintritt der Fällung an. „Sofort" bedeutet, dass der Niederschlag schon bei Einstellung des Schnittes, also circa $^1/_2$ Minute nach dem Einlegen in die Fixirungsflüssigkeit, ausgeschieden war. Eine 0 bedeutet, dass innerhalb 24 Stunden überhaupt kein Niederschlag entstand. Die sofort sich abscheidenden Fällungen nehmen zwar auch bei weiterer Beobachtung noch zu, die Hauptwirkung geschieht aber blitzartig, sogleich beim Eindringen des Fixirungsmittels, das dadurch seine hohe Fällungskraft offenbart. Andere Stoffe (in der Tabelle „langsam"), zu denen auch die Osmiumsäure gehört, fangen, selbst bei optimaler, schwach saurer Reaction, erst in 2—3 Minuten an zu wirken, und dem langsamen Anfang entspricht auch ein langsamer Fortgang, so dass erst nach $^1/_2$—1 Stunde jener Grad der Fällung erreicht ist (Fig. 9), der bei anderen Mitteln (Fig. 10) „sofort" eintritt. Die saure und alkalische Reaction wurde nicht titrimetrisch gemessen, was zum Vergleiche auch nicht nöthig war, da die ganze Reihe der Fixirungsmittel stets mit ein und derselben Lösung geprüft wurde. War bei alkalischer Reaction eine Verzögerung zu bemerken, so wurde das in der Tabelle durch „verzögert" angedeutet. Die Concentration der einzelnen Bestandtheile des FLEMMING'schen Gemisches wurde höher gewählt als in diesem selbst, um die Stoffe unter den günstigsten Bedingungen vorzuführen. Controlversuche ergaben, dass auch im Gemisch die einzelnen Componenten noch in einer Concentration enthalten sind, die sofortige Fällung gestattet.

Weiteres ersieht man aus der Tabelle (S. 27), der zum Vergleich noch Pikrinsäure (0,5 Proc. in Wasser), Sublimat (0,5 Proc. in Wasser) und Platinchlorid 1 Proc. (HERMANN's Mischung enthält 0,8) beigefügt sind.

Die langsamere Wirkung der Osmiumsäure beruht nicht etwa darauf, dass sie langsamer diffundirt als die anderen, sondern ist wirklich der Ausdruck ihrer geringeren Fällungskraft. Das geht noch aus zweierlei hervor. Erstens aus den Versuchen in Fläschchen, bei denen durch starkes Umschütteln die Osmiumsäure sich gut mit der Eiweisslösung vereinigen lässt. Trotzdem erscheint der Niederschlag genau so langsam wie in den Hollundermarkschnitten. Zweitens beginnt

Fixirungsmittel	Deuteroalbumose		Serumalbumin		Casein		Nuclein		Nucleinsäure	
	sauer	alkal.	sauer	alkal.	sauer	alkal.	neutral (sauer)	alkal.	sauer	alkal.
FLEMMING's Mischung	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort
Osmiumsäure 1 Proc.	langsam	0	langs.	0	0	0	0	0	0	0
Chromsäure 0,5 Proc.	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort
Essigsäure 5 Proc.	0	0	0	Ueberschuss löst	0	Ueberschuss löslich	„	„	langs.	„
Sublimat 0,5 Proc.	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort	langs.	langs. (verzögert)	„	langs. (verzögert)
Pikrinsäure 0,5 Proc.	„	„	„	„	„	verzögert	„	langs.	„	langs.
Platinchlorid 1 Proc.	„	„	„	„	„	sofort	sofort	sofort	sofort	sofort
HERMANN'sche Lösung	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„

in diesen, wenn alkalische Lösungen injicirt waren und stundenlang die Osmiumsäure erfolglos gewirkt hatte, beim Ansäuern mit Essigsäure die Fällung auch erst nach 2—5 Minuten und steigert sich langsam. In diesem Falle hatte doch die Osmiumsäure vollkommen Zeit gehabt, sich gleichmässig in der Eiweisslösung zu vertheilen.

Es unterliegt daher keinem Zweifel mehr, dass *die Fällungskraft der Osmiumsäure eine viel geringere ist als die der Chromsäure, Pikrinsäure, des Quecksilber- und des Platinchlorides*, und dass FLEMMING's Vermuthung, dass die Osmiumsäure „momentan tödtet", die anderen aber langsamer, nicht eintrifft. Das Umgekehrte ist richtig.

Um obige Tabelle noch zu vervollständigen, sei erwähnt, dass die FLEMMING'sche Lösung, als Additionswirkung ihrer Componenten, aus sauren und alkalischen Lösungen wasser-unlöslich fällt: Pepton (unsicher), Deuteroalbumose und Protalbumose, Albumine, Globuline, Casein und Conglutin, Nuclein, Nucleinsäure, Hämoglobin. Der Entwässerungsalkohol würde also nach guter Durchfixirung mit dem Gemisch nichts mehr zur secundären Ausfällung vorfinden; die Präparate geben das reine primäre Fixirungsbild. Die schwache Essigsäure des Gemisches kann nicht einmal gegenüber der Nucleinsäure als Fällungsmittel wirken, sondern versieht nur die Rolle eines Ansäurers, hauptsächlich für die Osmiumsäure, nebenbei auch für die Chromsäure, die durch alkalische Reaction etwas gehemmt wird. Den Hauptantheil an der Wirkung des Gemisches hat die Chromsäure, die bis zum Beginn der Osmiumwirkung die Hauptmasse der Eiweisskörper bereits gefällt haben wird. Der noch gelöste Rest ist dann auch der Osmiumsäure zugänglich, die nun, da die Chromsäure partiell in dem Niederschlag gebunden ist, das Uebergewicht über sie hat. Es ändert sich gewissermaassen das Mischungsverhältniss in jedem Raumtheilchen, die Chromsäure wird absolut verdünnter, die Osmiumsäure relativ concentrirter und fällt den Rest vielleicht allein aus. In alle Einzelheiten diese verwickelten

Wirkungen zu verfolgen, ist wohl jetzt noch nicht möglich. Es müsste aber in der angedeuteten Richtung gelingen, die Wirkungsweise des Gemisches physikalisch-chemisch zu zerlegen. Der Chromsäure allein würde die Fällung der Nucleoalbumine, wie Casein und Conglutin, und der Nucleinsäure zuzuschreiben sein, die Fällung der Deutero- und Protalbumose, des Albumins und Globulins, sowie des Hämoglobins würde sie mit der Osmiumsäure gemeinsam zu Ende führen. Hierbei würde die letztere aber stets der Chromsäure nachhinken. Ganz unbetheiligt ist die Osmiumsäure an der „Fixirung" der Nucleoalbumine (Casein, Conglutin), des Nucleins und der Nucleinsäure. Hierüber gibt die Tabelle auf p. 27 Auskunft. Ueber Pepton vergleiche man p. 41.

Die Ueberschätzung der Fällungskraft der Osmiumsäure spricht sich auch in den Erklärungen aus, welche einige Forscher von dem verschiedenen Fixirungszustande an der Peripherie und im Innern der Gewebsstücke zu geben versuchen. FLEMMING selbst (XI, p. 163) nimmt an, dass die Chromsäure und die Essigsäure seines Gemisches zwar schneller diffundiren und in das Gewebsstück schneller eindringen als die Osmiumsäure, diese aber schneller, momentan, wirkt. So gewährt, nach FLEMMING (XI, p. 163), die Peripherie das Bild der reinen Osmiumwirkung (deutliche Nucleolen, undeutliche Kerngerüste), das Innere mit schönen Chromatingerüsten dagegen dasjenige der combinirten Wirkung mit den Säuren. Da nun nach unserer Tabelle die Fällungskraft der Chromsäure grösser als die der Osmiumsäure ist, so muss doch die erstere, wenn sie beim Eindringen ins Gewebsstück der letzteren vorauseilt, auch zuerst Ausfällungen geben. Die Peripherie müsste also eher das Bild reiner Chromsäurewirkung an sich tragen. In der That stimmt die Beschreibung DRÜNER's (II, p. 275) damit sehr gut überein: „Die am meisten peripher gelegenen Zelllagen sind für feinere, auf die Structur der Spindel gerichtete Untersuchungen gänzlich unbrauchbar. Nur die chromatischen Schleifen treten scharf und gut gefärbt hervor, alles andere ist bis auf spärliche Reste zerstört und in einen feinkörnigen Detritus verwandelt." Hier liegt sicher starke Chromsäurewirkung vor, die sich nach dem Innern zu desshalb abschwächt, weil hierhin ja nur verdünntere Chromsäure vordringt. Auch die Beschreibung, die RAWITZ (II, p. 577) gibt, erklärt sich so viel sachgemässer, als durch die auch von ihm acceptirte Annahme FLEMMING's, dass die Osmiumsäure stürmisch und zertrümmernd wirkt.

Schon aus dem Mitgetheilten ergibt sich, dass FLEMMING's Mischung kein unfehlbares Fixirungsmittel ist, sondern dass sie erst recht geeignet ist, Artefacte zu erzeugen. Hier sei beispielsweise noch erwähnt, dass FLEMMING selbst (XI, p. 165) jetzt die feinkörnige Beschaffenheit der Kerngrundsubstanz in Präparaten aus der Mischung nicht mehr ohne weiteres als naturgetreu auffasst, dass er Zweifeln hieran einige Berechtigung zuerkennt, während er früher (III, p. 279 Anmerk.) die volle Naturtreue der Bilder vertheidigte. Als Gerinnungen des frisch homogen erscheinenden Kernes durch FLEMMING's Gemisch deuten auch O. SCHULTZE (I, p. 195), MEVES (I, p. 8 und 9), LÖWIT (I, p. 228) die feingranulirten Massen, die das Kerninnere erfüllen.

9. Hermann's Gemisch
(0,8 Proc. Platinchlorid, 0,25 Proc. Osmiumsäure, 5 Proc. Essigsäure).

Nach Hermann (I, p. 59) soll sich sein Gemisch dadurch vor dem vorigen auszeichnen, dass es die Protoplasmastructuren unter leichter Bräunung besser zur Anschauung bringt. Das Gemisch ist durchweg stärker und besitzt sicher eine grössere Fällungskraft als das Flemming's, die besonders durch den hohen Essigsäuregehalt (5 Proc.!) gesteigert wird. Durch ihn wird wohl jede alkalische Reaction der zu fixirenden Objecte überwunden und die Osmiumsäure optimal fällungskräftig. Aus der Tabelle auf p. 27 wird man ersehen, dass das Platinchlorid vollen Ersatz für die Chromsäure bietet, so dass Hermann's Mischung durchaus die gleichen fällenden Eigenschaften hat, wie diejenige Flemming's, nur noch gesteigert. Auch die einzelnen Componenten der Mischung wirken in derselben Weise nach und neben einander, wie bei der Flemming-schen Mischung geschildert wurde. Nur wird die stärkere Essigsäure auch die Nucleinsäure wenigstens partiell fällen.

Anhang. Alkalische Lösungen.

1) Lysol wurde bis jetzt nur von Reinke (I, p. 415—420) angewendet, der damit einen neuen Structurbestandtheil des Kernsaftes, das Oedematin, nachzuweisen versucht. Das seifenreiche Gemenge, das als Lysol in den Handel kommt, scheint mir zu cytologischen Untersuchungen durchaus ungeeignet, da es, wie Reinke selbst angibt, stark löst (z. B. das Chromatin) und verquillt, so dass bei der Nachbehandlung mit Alkohol oder 2-proc. Osmiumsäure vielerlei Kunstproducte entstehen können. Reinke's Darstellung entbehrt aller Kritik, die hier ganz besonders am Platze gewesen wäre. Das Oedematin ist, wie auch A. Zimmermann (IV, p. 43) hervorhebt, vorläufig in die Reihe der artefactverdächtigen Zellelemente einzureihen, mit denen uns die allerneueste Zellforschung so verschwenderisch beschenkt.

Kein einziger der von mir geprüften Eiweisskörper (Deuteroalbumose, Serumalbumin, Casein, Nucleinsäure, Hämoglobin) wurde von 10-proc. Lysol gefällt, was ja von vornherein zu erwarten war.

2) Laugenalkohol (80 Proc. Alkohol mit $^1/_{40}$—$^1/_4$ Proc. NaOH). Nach den Erfolgen, die Held (II, p. 207) mit diesem von ihm eingeführten Mittel bei der Untersuchung der Nervenzellen hatte, scheint es mir noch nicht ganz klar, welcher Werth dem Laugenalkohol zuzuschreiben ist. Jedenfalls besitzt er doch lösende Eigenschaften, gerade das Gegentheil von dem, was wir von einem Fixirungsmittel zu verlangen gewöhnt sind. Es würde also wohl darauf ankommen, was in der lebenden Zelle der Laugenalkohol von frisch sichtbaren Structuren hinwegnimmt, wie viel er unverändert stehen lässt. In den Nervenzellen sah es wirklich so aus, als ob nur die sog. Nissl-Körper verschwunden wären, alles andere aber wenig verändert sei. Da aber (Held II, p. 207 Anmerk.) auch die Nucleolen aufgelockert, vielleicht partiell gelöst werden, so wird es noch ausgedehnter Untersuchungen bedürfen, um die Wirkungssphäre des neuen Mittels genauer abzugrenzen.

In alkalischen Lösungen von Eiweisskörpern mit höherem Alkaligehalt, als der Laugenalkohol selbst, wirkt dieser wie gewöhnlicher

Alkohol, fällend, gemäss der Hemmung, die er durch die Reaction erfährt. So wurde eine 0,2 Proc. KoH enthaltende Lösung von Serumalbumin durch schwachen Laugenalkohol (1/4 Proc. NaHO) im Laufe von 2 Tagen doch ausgefällt, nachdem sie in den ersten 24 Stunden nur opalescent gewesen war. Sauren Lösungen gegenüber wird der Laugenalkohol erst recht als reiner Alkohol wirken, sobald er neutralisirt hat werden können. Damit scheint mir das Principielle des neuen Mittels erschöpft zu sein. Die einzige Wirkung, die ein starker Laugenzusatz haben könnte, wäre die, dass die Fällungskraft des Alkoholes in an und für sich schon schwach alkalischen Geweben noch mehr herabgedrückt und durch etwaige Neutralisirung saurer ebenfalls geschwächt wird.

Kapitel III. Die Fällungsform der Eiweisskörper.

I. Bau und Entwicklung der Fällungsformen.

Nach der Form, in der die Eiweisskörper von den Fixirungsmitteln ausgefällt werden, habe ich früher (II, p. 771) zwei Gruppen unterschieden: Granulabildner und Gerinnselbildner. Zu der ersteren wurden gestellt Pepton und Albumosen, bedingungsweise Hämoglobin, Nuclein und Nucleinsäure, zur zweiten Albumine und Globuline, die Nucleoalbumine (Casein und Conglutin) und mit gewissen Einschränkungen Hämoglobin. Es wurde auch bereits (II, p. 770, 772, 774) auf die Beziehungen zwischen der Reaction und der Fällungsform der Granulabildner bei den sog. neutralen Fixirungsmitteln hingewiesen. Diese frühere Eintheilung ist durch zahlreiche neue Versuche fast ganz bestätigt worden und daher beizubehalten, nur das Nuclein ist zu den Gerinnselbildnern zu stellen aus später zu erörternden Gründen. Hämoglobin und Nucleinsäure könnten als bedingte Granulabildner auch fernerhin noch besonders hervorgehoben werden.

Die Fällungsform der Eiweisskörper ist mikroskopisch leicht erkennbar, wenn sie scharf ausgeprägt ist. Uebergänge aber bedürfen der färbungsanalytischen Untersuchung, und besonders müssen auch die Gerinnsel auf granuläre Einschlüsse, die im ungefärbten Niederschlag sich verbergen könnten, gefärbt werden. Doppelfärbungen aus Farbgemischen liessen sich hierzu sehr wohl anwenden, führen aber viel langsamer zum Ziele als Differenzirungsfärbungen mit Contrastnachfärbungen, und zwar desshalb, weil die Zusammensetzung der Farbgemische gar keine so willkürliche und schwankende sein darf, wie vielfach behauptet wird. Im nächsten Theil wird das an vielen Beispielen gezeigt werden. Die Untersuchung der Fällungen ist also bequemer mit Differenzirungsfärbungen, und zwar kann man anwenden: Benda-Heidenhain's Eisenalaun-Hämatoxylin, Gram'sche Färbung, die Sporen- oder Tuberkelbacillenfärbung mit Ziehl's Carbolfuchsin und endlich Altmann's Säurefuchsin-Pikrinalkohol. Die Reihenfolge der genannten Methoden gibt auch zugleich ihre Leistungsfähigkeit an; Benda-Heidenhain's Methode, später als Eisen-Hämatoxylin bezeichnet, ist die empfehlenswertheste, die Differenzirung in der Eisenalaunlösung geht so langsam und sanft vor sich, dass äusserst feine

Granulationen im Gerinnsel noch sich heraus differenziren lassen. Aehnliches leistet die GRAM'sche Methode. Auch die Tuberkelfärbung kann man zwar durch Differenzirung mit recht schwachen Säuren sehr empfindlich machen, sie verlangt aber doch eine öftere Controle, und ebenso ist die Pikrinalkoholdifferenzirung nach ALTMANN im Allgemeinen zu stürmisch, sie setzt grosse Dichtigkeitsdifferenzen voraus, ist dann allerdings ausgezeichnet. Näheres über diese Fragen bringt ausser dem 2. Theil, auch schon das Kapitel über die Fällung von Gemischen.

Die Niederschläge der Gerinnselbildner sind bald mehr schollig oder häutig-faltig, bald und am häufigsten fein plasmatisch, gerüstig oder netzig, sie sehen aus wie der als feinpunktirt so oft beschriebene Zustand des Protoplasmas. Hieraus geht hervor, dass auch die Gerinnsel aus winzigen Körnchen (Globuliten) sich zusammensetzen, aber diese granulären Elemente sind zu grösseren Aggregaten stets vereinigt und alle von gleicher Grösse. Selbst den subtilsten Differenzirungen gelingt es nicht, in solchen Gerinnseln von Albumin, Globulin oder Nucleoalbumin grössere oder stärker gefärbte Granula hervorzuheben.

Die Granulabildner dagegen geben isolirte oder paarweise und in kurzen Kettchen oder nach Art der Hefesprossverbände zusammengelagerte schöne Körner von sehr verschiedener Grösse. Es lässt sich stets eine ganze Reihenfolge von winzigen, mikrokokkenähnlichen Granulis bis zu einzelnen Riesen zusammensuchen. Von der Concentration der Eiweisslösung und der Art des Fixirungsmittels hängt es nur noch ab, welche Grösse vorherrscht. Mit den oben genannten Differenzirungsfärbungen ist es daher stets möglich, Doppelfärbungen zu erzielen. Sie werden um so leichter gelingen, je grösser die Differenzen im Durchmesser der Granula sind. Nur in einzelnen Fällen, z. B. bei Sublimatfällung oder bei der Ausfällung sehr concentrirter Lösungen mit ohnmächtigen dünnen Fixirungsmitteln wird das Korn ein gleichmässigeres und die Doppelfärbung oft ganz unmöglich. Aber auch jetzt noch bleibt die andere Eigenschaft der Granulabildner, in isolirten Körnern sich abzusetzen, deutlich erhalten. Bei den bedingten Granulabildnern (Hämoglobin, Fig. 6, p. 45, und Nucleinsäure, Fig. 5, p. 43) wird man oft die Granula zu Kettchen oder Hefesprossverbänden ähnlichen Gruppen vereinigt finden, gewissermaassen als Uebergang zur eigentlichen Gerinnselbildung. Zu ihr kommt es aber noch nicht, auch sind die Granula noch viel zu gross und treten als scharf umschriebene Körner leicht hervor, während die echten Gerinnsel nur verwaschen fein punktirt erscheinen. Ein Vergleich der Figuren auf der Taf. und der Fig. 6, p. 45 und Fig. 8, p. 48, wird diesen Unterschied am besten veranschaulichen.

Spiegelfärbungen der Granula. Wenn man Granulagemische mit irgend einer der p. 30 genannten Färbungsmethoden untersucht, so wird man je nach dem Grade der Differenzirung verschiedene Bilder erhalten, von denen besonders zwei hervorzuheben sind, die Vollfärbung und die Spiegelfärbung der grösseren Granula. Die Vollfärbung bleibt nach schwächerer Entfärbung zurück, alle grossen und grössten Granula sind noch total gefärbt, alle kleineren entfärbt und einer Contrastfärbung zugänglich (Taf., Fig. 17—20). Man hat es ganz

in seiner Hand, durch kürzere oder längere Differenzirung alle Granula von einer bestimmten Grössenordnung ab aufwärts noch gefärbt zu lassen, worüber der 2. Theil der Arbeit zu vergleichen ist. Dort wird sich auch der Grund angeben lassen, warum auch Farbgemische (Taf., Fig. 16, 21, 24, 25) die Granula nach der Grösse chromatophil sortiren.

Durch stärkere und längere Wirkung der entfärbenden Lösungen lässt sich die Spiegeldifferenzirung der grossen Granula hervorrufen. Wie bei einer Schützenscheibe tritt ein allein noch gefärbtes Centrum oder ein Spiegel scharf hervor, umgeben von einem ganz entfärbten und durch Contrastfarben secundär färbbaren Rand oder Schale oder Rahmen. Von dem Grade der Differenzirung hängt die Breite des Spiegels ab, er ist sehr breit bei geringer, sehr klein und einem Scheibenspiegel um so ähnlicher bei stärkerer Differenzirung (Taf., Fig. 11, 26—30 u. Fig. 2, p. 34). Selbst aus Farbgemischen gehen durch simultane Doppelfärbung ohne jede weitere Differenzirung die schönsten Spiegelfärbungen hervor (Taf., Fig. 12—15, 37), z. B. in einem Gemisch von Granulis von 0,7—8 μ Durchmesser, das aus 40 Proc. Deuteroalbumose mit 2,5 Proc. Kaliumbichromat gefällt wurde, durch folgendes Farbgemisch. Auf 1 ccm 0,5-proc. Säurefuchsin 15 ccm 0,5 Lichtgrün und 15 ccm Wasser, Färbezeit 6 Min.; Wasserspülung, Trocknen, Balsam. In den grossen Granulis ist ein tiefrothes, meist recht breites Centrum von einer schön lichtgrünen oder bläulich-mischfarbenen Schale umgeben, während die kleinen und kleinsten Granula rein lichtgrün oder bläulich gefärbt sind (Taf., Fig. 14).

Die Spiegeldifferenzirung ist sicher weiter nichts, als eine zur rechten Zeit unterbrochene Entfärbung der durchweg gleichartig gebauten Granula, deren Micelle in der Peripherie ebenso zusammengelagert sind, wie im Centrum, in den kleinsten Granulis nicht anders wie in den grossen. Dann ist es ja selbstverständlich, dass aus einem kleinen Granulum die ganze gespeicherte Farbe schneller herausgelöst werden wird als aus einem grösseren, und dass in diesem letzteren die Entfärbung an der Peripherie beginnt und nach dem Centrum fortschreitet. Man könnte ja auch noch vermuthen, dass die Granula concentrisch geschichtet sind, dass die zuerst ausgefällte Anlage oder der Keim, der durch neue Auflagerungen allmählich zu den grossen Granulis heranwächst, am dichtesten, substanzreichsten ist und dass die später sich ansetzenden Schichten, entsprechend der in der Mutterlauge sich einstellenden Verdünnung, auch immer lockerer gebaut sind. Dann wäre ja Spiegelfärbung erst recht unausbleiblich, ohne ihren rein mechanischen Charakter zu verlieren. Die simultane Spiegelfärbung wird im 2. Theil erklärt werden.

Das weitere Wachsthum der zuerst abgeschiedenen winzigen Globuliten wird abhängen von der Diffusionsgeschwindigkeit des gelösten Eiweisskörpers. Ist diese sehr gering, wie bei den stark colloidalen Albuminen, Globulinen und Nucleoalbuminen, so wird es nicht zur Anlagerung neuer Schichten kommen, weil die Concentrationsdifferenz um das ausgeschiedene Körnchen herum nicht schnell genug durch hinzudiffundirende Eiweismolekel ausgeglichen wird. Diese werden zwischen den zuerst ausgeschiedenen Körnchen weiter ausgefällt, und so entstehen die aus winzigen zusammengehäuften und an einander hängenden Globuliten

aufgebauten feinpunktirten Schollen, Häutchen und plasmaähnlichen Aggregate der Gerinnselbildner.

Die nicht so stark colloidalen Stoffe aber, wie Pepton, Albumosen, Hämoglobin, Nucleinsäure, ergänzen durch Diffusion mehr oder weniger leicht und vollständig die Concentrationsdifferenz, und neue Substanz wird auf die ersten Granulationen abgeschieden, wodurch diese zu den grösseren Granulis heranwachsen, und zwar zu um so grösseren, je concentrirter die Lösung ist.

Zwischen den isolirten Granulis verschiedener Grösse findet man auch oft Zwillingsbildungen aus zwei gleich grossen Granulis (Fig. 4 *a* p. 37) oder Sprossungsbilder, wo ein kleineres Korn an ein grösseres sich angelagert hat (Fig. 4 *a*, p. 37, Fig. 6 *b*, p. 45). Während die ersteren als Theilungszustände erscheinen könnten, rufen die letzteren den Eindruck einer hefeartigen Sprossung hervor — alles wohlgeeignet, etwaige granuläre Artefacte in Schnitten zu verkennen. (Man vergleiche hierzu Fig. 1—4, Fig. 5, Fig. 6 und Taf., Fig. 29, 30, 37.)

II. Die Granulabildner.

1. Deuteroalbumose als Typus der Granulabildner.

a) Keine Fällung: Salpetersäure, Essigsäure (Ferrocyankalium und Essigsäure).
b) Fällung in Wasser löslich: Alkohol (Fig. 17), Aceton, Pikrinsäure. Pikrinsäure-Alkohol, Pikrinschwefelsäure.
c) Fällung nur aus saurer Lösung, in Wasser und Alkohol unlöslich: Osmiumsäure (Fig. 3 *f*, p. 35), Kaliumbichromat (Taf., Fig. 11—18, Fig. 3 *d* u. *e*, p. 35), Altmann's Gemisch (Fig 4, p. 37), Jodkaliumquecksilberjodid.
d) Fällung bei jeder Reaction, in Wasser und Alkohol unlöslich: Tannin, Chromsäure (Fig. 25—28, Taf.), Sublimat (Fig. 2, p. 34), Platinchlorid (Taf., Fig. 19—23, Fig. 1 *a*, p. 34, Fig. 3 *a*, p. 35). Formaldehyd (Taf., Fig. 29, 30), Osmiumessigsäure, Flemming's (Fig. 1 *b*, p. 34, 3 *c*. p. 35) und Hermann's Gemisch.

1) Fällungsform und Einfluss der chemischen Reaction. Die unter b aufgezählten Fixirungsmittel fällen zwar bei jeder Reaction die Deuteroalbumose in plumpen, knorrigen Bildungen. die auch regelmässigere Granulaformen annehmen können (Fig. 17), sind aber doch für Granulabildung aus Deuteroalbumose bei der Fixirung von Gewebsstücken bedeutungslos, weil schon eine kurze Benetzung der aufgeklebten Schnitte mit Wasser ausreichen muss, um die Fällungen ganz oder theilweise zu lösen. In alkalischen Gewebsstücken würden die Körper der Abtheilung c keine Granula ausfällen können, selbst bei genau neutraler Reaction nicht, jedoch würde dann eine minimale, sehr langsam sich absetzende Ausscheidung zu berücksichtigen sein, die aber nicht aus typischen Granulis, sondern aus unbedeutenden Gerinnselchen bestehen würde (Fig. 1 *d*, p. 34). Bei freier Fällung neutraler Albumoselösungen oder solcher, die eben eine ganz geringe saure Reaction erkennen lassen, würden mehrere Tage vergehen, bevor ein deutlicher Bodensatz sichtbar wäre. Früher (II. p. 770) wurde behauptet, dass reine Osmiumsäure in alkalischer Albumoselösung viel kleinere, langsamer sich absetzende Granula gäbe, als in saurer. Diese Angabe ist dahin zu berichtigen, dass alkalische Reaction

die Fällungskraft der Osmiumsäure vollkommen aufhebt. Wenn nach mehreren Tagen ein schwacher Bodensatz kleiner Granula oder zarter Gerinnselchen erscheint, so ist das bereits eine secundäre Erscheinung, eine Folge der Vereinigung des freien Alkalis mit dem Osmiumtetroxyd zu osminsaurem Kali und sonach Neutralisirung der Lösung, die dann von dem Rest nicht gebundener Osmiumsäure langsam ausgefällt wird. Das Gleiche gilt für ALTMANN's Gemisch. Typische Granula sind nur bei saurer Reaction von den unter c aufgezählten Stoffen zu erwarten, dann aber unfehlbar. Niemals entstehen jetzt Gerinnsel, sondern stets ein schönes Gemenge verschieden grosser Granula.

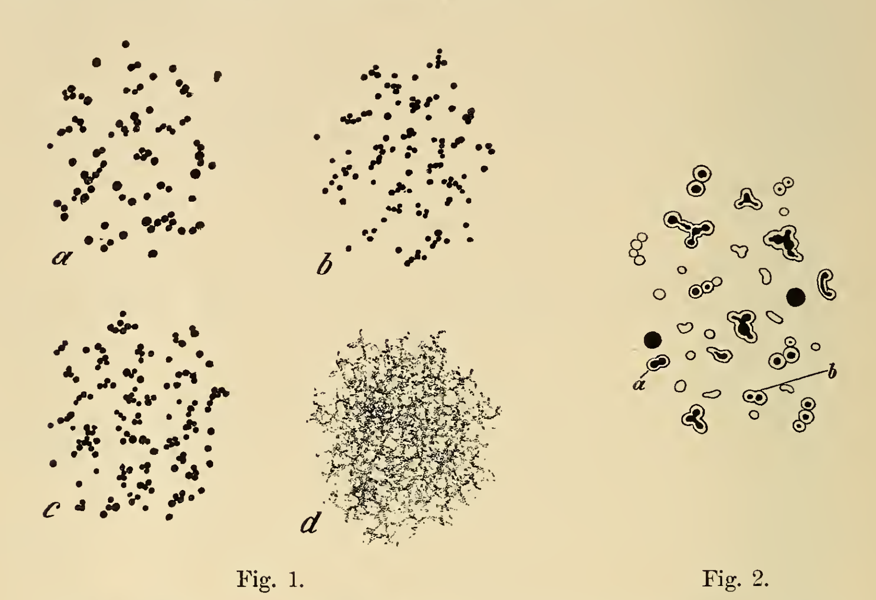


Fig. 1. Fig. 2.

Fig. 1. Fällung einer deutlich alkalischen Albumoselösung, 5-proc., in 0,2 Proc. KOH mit *a* 1-proc. Platinchlorid, *b* FLEMMING'scher Lösung, *c* 0,5-proc. Chromsäure, *d* ALTMANN's Gemisch. Die „sauren“ Fixirungsmittel (Fig. *a*—*c*), der Gruppe d angehörig, geben auch bei alkalischer Reaktion schnell typische Granula, während ALTMANN's Gemisch sehr langsam unbedeutende Gerinnsel fällt. Man vergleiche dazu Fig. 4. (Vergr. 600.)

Fig. 2. Albumose, 20-proc., eben sauer mit conc. wässrigem Sublimat gefällt, mit Eisenhämatoxylin gefärbt und auf Spiegel differenzirt. Man beachte die verschiedenen Verschmelzungsformen der zunächst gefällten Globuliten, woraus sich dann auch Theilungs- und Zwillingsbilder (*a* und *b*) ergeben. (Vergr. 1500.)

Schwach alkalische oder neutrale Reaction verzögert zwar auch die Fällung durch viele der Fixirungsmittel unter d, aber doch nur wenig, innerhalb 20 Stunden ist sie vollständig. Der Sublimatniederschlag (Fig. 2) ist zwar auch vorherrschend granulär, neigt aber besonders in schwachen Albumoselösungen zur Bildung grösserer Aggregate der winzigen Granula, wodurch flockige, an Gerinnsel erinnernde Bildungen unter die isolirten Graunla sich einschieben. Ferner ist noch zu beachten, dass hier häufiger als bei anderen Fixirungsmitteln die eben gefällten, noch flüssigen Globulite mit einander verschmelzen und verkleben, wodurch solche Formen, wie Fig. 2 sie wiedergiebt, in buntem Durcheinander entstehen. Man beachte hier neben reinen,

isolirten Kugeln und Kettchen solcher auch die unregelmässigen Formen, deren Spiegelfärbung immer genau dem Umriss entspricht. Besonders wichtig sind die Verschmelzungen von zwei Granulis. Sind diese nur äusserlich an einander gehängt, so hat jedes seinen besonderen Spiegel (Fig. 2 bei *b*), sind die Globulite aber inniger, zu bisquitähnlichen Körperchen verschmolzen, so hat auch der Spiegel diese Form und ahmt die Theilung eines von hellem Hof umgebenen Körperchens nach (Fig. 2 bei *a*). Man vergleiche auch später den Abschnitt über die Methoden der Centralkörperforschung. Bei alkalischer Reaction steigert sich die gerinnselige Abscheidung durch Sublimat und unterdrückt die granuläre oft vollständig.

Ebenso wie das Sublimat erzeugt auch das Formaldehyd (10-proc. mit 40-proc. Albumose, Taf., Fig. 29, 30) sehr gestaltenreiche granuläre und chromosomenähnliche Fällungen, an denen sich dieselben Spiegelfärbungen wie an dem Sublimatniederschlag wiederholen lassen. Dem letzteren würde sich das Tannin anschliessen, das neben sehr winzigen auch grosse Granula und dazwischen Gerinnselchen erzeugt, besonders bei alkalischer Reaction. Da sich die Fällung im Ueberschuss des Tannins wieder langsam löst, so bekommt man auch viele Ringgranula.

Reine Granulafällungen geben bei jeder Reaction Chromsäure, Platinchlorid, Osmiumessigsäure, Flemming's und Hermann's Gemisch und zwar stets ein Gemenge von Granulis verschiedener Grösse, deren Durchschnittsmaass bei gleicher Concentration der Albumoselösung von dem Fixirungsmittel abhängig ist. Eine 10-proc., schwach saure Lösung würde z. B. folgende Granula geben.

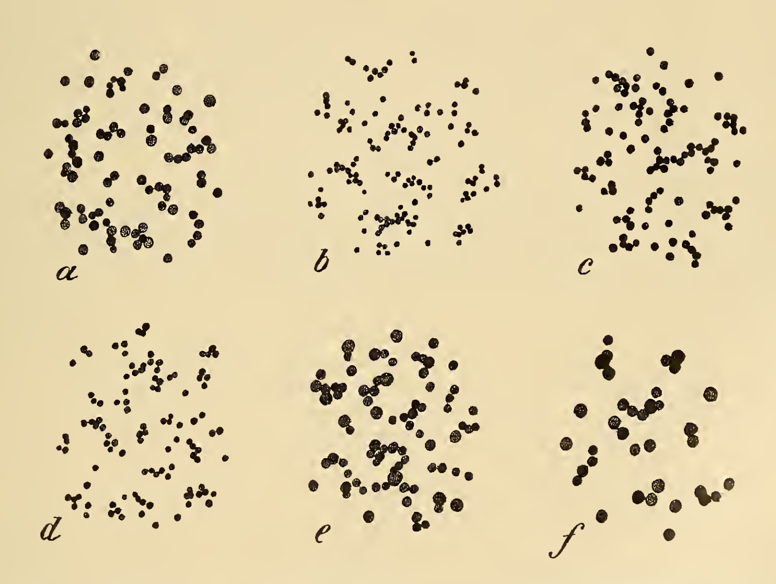


Fig. 3. Granula, aus schwach saurer, 10-proc. Albumoselösung gefällt mit *a* 1-proc. Platinchlorid, *b* 0,5 Chromsäure, *c* Flemming'scher Lösung, *d* 2,5 Kaliumbichromat, *e* Müller'scher Lösung. Zum Vergleich in *f*, eine 3-proc., schwach saure Albumose mit 1 Proc. Osmiumsäure, die viel grössere Granula fällt. Man vergleiche auch die Tabelle und Fig. 1 und 4. (Vergr. 600.)

Fixirungsmittel.	Durchmesser der Granula.
1) ALTMANN's Gemisch	1—3 μ (Fig. 4 *a*).
2) 2,5-proc. Kaliumbichromat	0,5—0,7 μ (Fig. 3 *d*).
3) FLEMMING's Lösung	0,7—1 μ (Fig. 3 *c*).
4) 0,5-proc. Chromsäure	0,4—0,5 μ (Fig. 3 *b*).
5) HERMANN's Lösung	0,7 μ, fast ganz gleichmässig.
6) 1-proc. Platinchlorid	0,7—1 μ (Fig. 3 *a*).
7) 7-proc. Sublimat	0,4—1 und noch kleinere.

Man sieht, dass einige Fixirungsmittel (No. 2, 4, 5) sehr gleichmässiges Korn geben, vor allem die HERMANN'sche Lösung, während andere ein bunteres Gemenge von Granulis verschiedener Grösse erzeugen, besonders ALTMANN's Gemisch. Dieses gibt zugleich die grössten Durchmesser, Chromsäure die kleinsten, danach Sublimat.

2) Einfluss der Concentration der Albumoselösung und des Fixirungsmittels. Es ist wohl selbstverständlich, dass bei gegebener Concentration des Fixirungsmittels, z. B. in der üblichen Stärke der Histologie, nicht bloss die Mächtigkeit des Niederschlages im Allgemeinen, sondern auch seine feine Structur, also auch die Grösse der Granula von der Concentration der zu fällenden Lösung abhängt. Das um so mehr, als doch sicher die meisten Fällungen chemische sind, d. h. wirklich neue chemische Verbindungen zwischen Fixirungsmittel und Albumose entstehen. Endlich wird das Wachsthum der als Sphärokystalle zu betrachtenden Granula in einer stärkeren Mutterlauge länger anhalten und zu grösseren Individuen führen müssen als in einer verdünnten. Nur solche Fällungsmittel, wie Sublimat (7-proc. in Wasser) oder Tannin (2-proc.), die mit grosser Vehemenz augenblicklich fällen und daher leicht gemischt granulär-gerinnselige Niederschläge geben, werden weniger von der Concentration in dem angedeuteten Sinne beeinflusst. Alle diejenigen aber, die reine Granulagemische abscheiden, wirken nicht so heftig, beim Zugiessen trübt sich zwar die Albumoselösung sogleich mehr oder weniger milchig, die Abscheidung und völlige Ausfällung concentrirter Lösungen nimmt aber einige Zeit in Anspruch. Die zunächst ausgefällten, minimalen Krystallisationscentren können also in stärkerer Lösung länger wachsen als in einer dünneren, die bald ganz erschöpft ist und nicht einmal noch genug Material zur Abscheidung neuer solcher Centren enthält. In der concentrirten Lösung aber schreitet neben dem Wachsthum der zuerst enstandenen längere Zeit noch die Abscheidung neuer winziger Anfänge fort. Das Resultat ist leicht construirbar, die dünnere Lösung gibt durchschnittlich viel kleinere Granula und ausserdem viel gleichmässigere, grössere und riesenhafte werden ganz fehlen. Anders in der concentrirten Lösung, die bei grösserem Durchschnittskorn auch zahlreiche grosse und sehr grosse Granula liefern muss. Eine Grenze hat das natürlich auch, denn wenn die Albumoselösung zu stark genommen wird, dann reicht die nicht mit gesteigerte Concentration des Fixirungsmittels nicht mehr aus. Man wird bei einer gewissen Concentration sich das Verhältniss gewissermaassen umkehren sehen, trotz des hohen Albumosegehaltes entstehen nur noch winzige, gleichmässige Granula. So ergibt sich, dass ein Optimum im quantitativen Verhältniss zwischen Concentration der Albumoselösung und der des

Fällungsmittels bestehen muss, bei dem das bunteste Gemisch von Granulis und besonders auch viele grosse entstehen. Es wurde davon abgesehen, dieses Optimum genau quantitativ festzustellen, da die Züchtung solcher Gemische sehr bald durch Probiren glückte. Hierüber vergleiche man den besonderen Abschnitt auf p. 38. Die Wechselbeziehungen zwischen Concentration der Albumoselösung und eines Fixirungsmittels, des ALTMANN'schen Gemisches, veranschaulicht folgende Tabelle, die aus einer grösseren Versuchsreihe herausgegriffen ist. Es wurden je 2 ccm von 10-, 7,5-, 5-, 2,5-, 1-, 0,5- und 0,1-proc. schwach-saurer Albumoselösung mit 1 ccm der unverdünnten ALTMANN'schen Lösung gefällt und andererseits mit Verdünnungen dieser auf $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_{10}$, $^1/_{50}$ und $^1/_{100}$ (je 1 ccm) eine 10-proc. Albumoselösung (je 2 ccm).

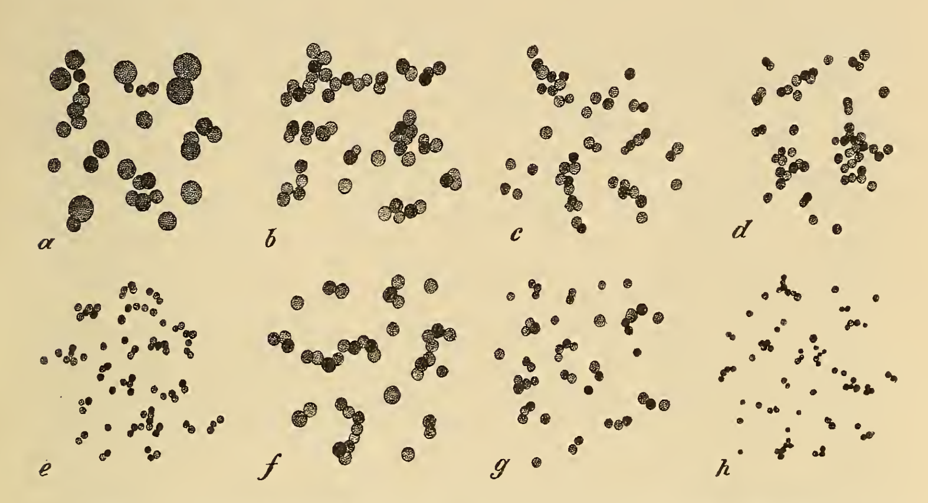


Fig. 4. *a*—*e* verschiedene Grösse der Granula, die von dem unverdünnten ALTMANN'schen Gemisch (Osmiumsäure-Kaliumbichromat) aus verschieden starken Lösungen von Deuteroalbumose (schwach sauer reagirend) gefällt werden: *a* 10-proc., *b* 3-proc., *c* 1-proc., *d* 0,5-proc., *e* 0,1-proc. Albumose; *f*—*h* dieselbe 10-proc. Albumoselösung wie in *a*, aber mit verdünntem ALTMANN'schen Gemisch gefällt: *f* $^1/_{10}$, *g* $^1/_{50}$, *h* $^1/_{100}$. (Vergr. 600.) Man vergleiche auch die beistehende Tabelle.

	Concentration der Albumose 2 ccm	Concentration des Fixirungsmittels 1 ccm	Grösse der Granula
1)	10-proc.	unverdünnt	1 —3 μ (Fig. 4*a*)
2)	3 „	„	0,7—1,5 „ („ 4*b*)
3)	1 „	„	0,5—0,7 „ („ 4*c*)
4)	0,5 „	„	0,5—0,7 „ („ 4*d*)
5)	0,1 „	„	0,4 „ („ 4*e*)
6)	10-proc.	0,1	0,5—2 μ (Fig. 4*f*)
7)	10 „	0,02	0,4 „ („ 4*g*)
8)	10 „	0,01	unter 0,4 und gerinnselig (Fig. 4*h*)

In den Versuchen waren natürlich keine äquivalenten Verhältnisse getroffen, was auch nicht beabsichtigt war, die Verdünnungen des ALTMANN'schen Gemisches konnten die 10-proc. Albumoselösung natürlich

nur partiell fällen, die Niederschläge bei $^1/_{50}$ und $^1/_{100}$ ALTMANN waren sehr gering; umgekehrt wurde die unverdünnte Lösung selbst durch 10 Proc. Albumose nicht ganz gesättigt, es blieb über dem reichlichen dickschlammigen Niederschlag klares Fixirungsmittel übrig. Annähernd gleiche Gemische durchschnittlich sehr grosser Granula, untermengt mit kleineren aller Abstufungen, ergab einerseits die unverdünnte ALTMANN'sche Mischung mit 10 und 7,5 Proc. Albumose, andererseits 10-proc. Albumose mit $^1/_2$ und $^1/_4$ verdünntem Gemisch. Nun nahm die Durchschnittsgrösse in beiden Reihen ab, was zum Theil die Fig. 4 und die Tabelle andeuten. Aus einer 0,1-proc. Albumoselösung fällte das unverdünnte Gemisch nur noch sehr winzige, gleichmässige Granula, die mit Staphylokokken wohl zu verwechseln wären (Fig. 4*e*). Ebensolche winzige Körnchen entstanden durch auf $^1/_{50}$ oder $^1/_{100}$ verdünnte ALTMANN'sche Mischung in 10-proc. Albumose (Fig. 4*g*, *h*). Steigert man deren Concentration bis zu 40 Proc. (40 g auf 100 Theile Wasser), so werden natürlich die Fixirungsmittel in der gebräuchlichen Stärke, selbst bei grossem Ueberschuss, nur partiell ausfällen und nicht so grosse Granula liefern, wie der reiche Albumosegehalt es gestattet. So fällt 1-proc. $PtCl_4$ aus 40-proc. Albumose nur Granula von 0,4—3 μ Durchmesser (Taf., Fig. 23) und lässt einen guten Theil der Lösung überhaupt ungefällt. Auch FLEMMING's, HERMANN's und ALTMANN's Gemisch oder 4-proc. Formaldehyd sind so starken Albumoselösungen nicht mehr gewachsen. Um diese ganz auszufällen, bedarf es stärkerer Concentration, z. B. 10-proc. $PtCl_4$, 2,5—5-proc. Chromsäure, 10-proc. Formaldehyd u. s. w.

3) Züchtung von Gemischen aus Granulis aller Grössen. Zu den färbungstheoretischen Versuchen bedurfte man derartiger Gemische, um an ein und derselben Substanz, die nur in verschieden grossen Körnern abgeschieden war, chromatophile Färbungen aus Farbgemischen zu erzielen. Ich (III, p. 5, 6) hatte früher empfohlen, stärkere und schwächere Lösungen getrennt zu fällen und später erst die Niederschläge auf dem Deckglas zu vermischen. Viel bequemer aber gelingt es, geeignete Mischungen aus 40-proc. Albumoselösungen zu züchten, nach zwei im Princip gleichen Methoden, die auf besondere Eigenschaften der benutzten Fixirungsmittel gegründet sind. Die eine Methode mit Kaliumbichromat, 2,5-proc., ist jedenfalls auch anwendbar auf Osmiumsäure oder ALTMANN's Gemisch und beruht darauf, dass diese „neutralen“ Lösungen bei eben ganz schwach saurer Reaction noch nicht ihre ganze Fällungskraft entfalten, sondern sehr langsam und gehemmt wirken. Erst ein weiterer Zuwachs an freier Säure erweckt die ganze Fällungskraft. Eine nahezu neutrale 40-proc. Albumoselösung wird mit 2,5-proc. Kaliumbichromat in eine PETRI-Schale zusammengegossen, auf 8 ccm der ersteren vielleicht 16 ccm der letzteren. Es wird zunächst gar keine Trübung eintreten, vielleicht erst in einigen Stunden, und sie wird auch innerhalb 20 Stunden sich nicht sehr steigern, ein Bodensatz scheidet sich nicht ab, obgleich nunmehr die Flüssigkeit milchig getrübt ist. Es haben sich jetzt lauter winzige Granula nur ausgebildet. Nunmehr wird mit 1 ccm Eisessig gut angesäuert, wonach sofort eine intensive Ausfällung erfolgt. Der neue dicke Niederschlag besteht aus einem prachtvollen Gemisch von Granulis aller Grössen (Taf., Fig. 11—18), neben winzigen Körnern (0,7 μ) liegen wahre Riesen (bis 8 μ) und dicht dabei alle Uebergänge zwischen beiden. Lässt man vor dem Ansäuern nicht 20 Stunden stehen, sondern

vielleicht nur 1—2, so wird man auch schon ganz brauchbare Gemische erhalten, in denen nur nicht so zahlreiche Uebergänge sich finden.

Die andere Methode geht davon aus, dass eine 40-proc. Albumoselösung von 1-proc. Platinchlorid (Taf., Fig. 23) erstens nur zum kleineren Theil gefällt wird und zweitens vorherrschend in winzigen oder doch durchweg mittleren Granulis (0,4—3 μ). Wenn eine solche Fällung 20—24 Stunden gestanden hat, dann giesst man vielleicht das gleiche Volumen 10-proc. Platinchlorid hinzu und fällt definitiv aus. Die am ersten Tag mit 1-proc. $PtCl_4$ entstandenen kleinen Granula dienen als Anziehungscentren, und auf ihnen schlägt jetzt die concentrirte Lösung neue Schichten von Albumose nieder. So entsteht eine Mischung von kleinen Granulis, in die 10—25 mal so grosse Solitäre reichlich eingebettet sind (Taf., Fig. 19—21). Der Durchmesser der Granula schwankt jetzt von 0,4—10 μ.

Dasselbe würde man erreichen, wenn man die 40-proc. Albumose zunächst mit 5-proc. Platinchlorid fällt, die milchig getrübte Lösung über dem breiigen Bodensatz nach 20 Stunden abgiesst und nunmehr mit 10-proc. Platinchlorid völlig ausfällt. In der milchigen Lösung schweben ebenfalls winzige Granula, die theilweise zu grossen Individuen heranwachsen.

Aehnliche Resultate würde man erhalten durch successive Fällung mit 1- und 10-proc. Formaldehyd, mit 0,25- und 2,5-proc. Chromsäure. Mit Sublimat gelangen solche Versuche nicht, aus dem p. 36 schon erörterten Grunde.

Dass die ungleich grossen Granula aus derselben Substanz bestehen, z. B. aus Platinalbumose, die doch sicher als neue chemische Verbindung entsteht, wird wohl Niemand bezweifeln, denn die Annahme, dass jede Grössensorte aus einer anderen Verbindung aufgebaut sei, ist doch nach der ganzen eben geschilderten Bildungsweise dieser Körperchen durchaus unwahrscheinlich. Das lässt sich natürlich nicht durch eine chemische Analyse beweisen, da man nicht unter der Oelimmersion die Granula gleicher Grösse herausfischen und sammeln kann. Ich werde später bei der Färbungstheorie auf diese Frage noch näher eingehen und dort auch Paul Meyer's (I) Einwände widerlegen.

4) Löslichkeit der Granula. Die auf p. 33 unter c und d genannten Fixirungsmittel geben Granula, die in Wasser vollkommen unlöslich sind, abgesehen von den sehr langsam und schwer löslichen, fast unlöslichen Tanninfällungen (p. 35). Da auch Alkohol nicht löst, Xylol und Paraffin selbstverständlich nicht, so müssten Albumosegranula, die in Geweben durch die Fixirung erzeugt worden wären, auch in den fertigen Präparaten noch enthalten sein und hier sich genau so gut färben, wie die auf Deckgläsern aufgetrockneten Granula unserer freien Fällungen. Einige weitere Erfahrungen über die Löslichkeit der Granula mögen noch zeigen, dass es auch kaum gelingen dürfte, Schnitte von etwaigen derartigen Kunstproducten ohne Schädigung des Objectes zu befreien. So sind die Granulafällungen mit Platinchlorid oder Kaliumbichromat unlöslich in: 2-proc. Natronlauge (5—10 Minuten), 10-proc. Soda (20 Stunden), concentrirter Salzsäure (5—10 Minuten), 5-proc. Schwefelsäure (10 Minuten), 50-proc. Salpetersäure (20 Stunden), concentrirter Essigsäure (längere Zeit), in kochendem Wasser. Ebenso verhalten sich nach einigen Proben auch die übrigen Fällungen, abgesehen von dem Sublimatniederschlag, der augenblicklich sich in 1—2-proc. Jodkalium löst (vergl. p. 23). Man sieht hieraus, dass die

Albumose durch die meisten Fixirungsmittel in sehr widerstandsfähige und unlösliche Granula verwandelt wird. Ob sie auch der künstlichen Verdauung widerstehen, wurde nicht besonders versucht. Es ist das aber wohl zu erwarten.

Auch durch die Farblösungen und sich anschliessenden Differenzirungen mit sauren Alkoholen werden die Fällungen nicht gelöst oder verunstaltet. Nur der Sublimatniederschlag macht eine Ausnahme gegenüber dem Pikrinalkohol, in dem er langsam unter Umwandlung in schön schaumige und vacuolige Figuren sich löst. Desshalb ist es kaum möglich, mit Säurefuchsin gefärbte Sublimatgranula mit Pikrinsäurealkohol zu differenziren.

Wegen der Granulalehre wurden noch die mit Osmiumsäure-Lösungen gefällten Albumosegranula auf ihre Löslichkeit genauer geprüft. Zunächst solche, die mit 1 Proc. Osmiumsäure + 1 Proc. Essigsäure erzeugt waren, also reine Osmiumalbumose. Wasserstoffsuperoxyd entfärbt zwar bald, schon bei leichtem Erwärmen der am Deckglas angetrockneten Granula, löst sie aber erst bei viel längerem Erhitzen und öfterer Erneuerung des H_2O_2. Zur Entfernung von Osmiumalbumose aus Gewebsschnitten würde sich H_2O_2 nicht eignen. Rohe Salzsäure, kurz erhitzt, löst nicht, ferner lösen nicht schwefligsaure Alkalien, ameisensaures Natron. Schon bei leichtem Erwärmen löst sehr schnell zwar concentrirte Salpetersäure, die aber wiederum für Schnitte unbrauchbar ist.

Sehr gut löst sich die Osmiumalbumose auf folgende Weise: 1) 5—10 Minuten lang behandeln mit 1-proc. Kaliumpermanganat, dem vielleicht auf 10 ccm 1 Tropfen concentrirte Salzsäure zugesetzt wird. 2) Nach dem Abspülen mit Wasser Entfärbung der tief goldgelb gewordenen Osmiumalbumose mit 1-proc. Oxalsäure, 5—10 Minuten. 3) Abspülen in heissem Wasser von etwa 50^0.

Verfolgt man die Wirkung schrittweise unter dem Mikroskop, so wird man sehen, dass nach der Oxydationswirkung des salzsauren Permanganates die rauchgraue Osmiumfarbe der Granula verschwunden, während ihre Form noch ganz unverändert ist. Lässt man nun unter dem Mikroskop zu den goldgelben Granulis die entfärbende Oxalsäure zufliessen, so wird ebenfalls keine Lösung zunächst eintreten, nur Entfärbung. Setzt man aber die Oxalsäurebehandlung länger fort, so beginnen die Granula schaumig-vacuolig sich aufzublähen als Zeichen der beginnenden Lösung, die man durch heisses Wasser beschleunigen kann. Es bleibt schliesslich keine Spur der Granula zurück.

Das beschriebene Verfahren schädigt Schnitte der mit Osmiumessigsäure fixirten Objecte (Magen- und Darmwand des Hundes, Wurzelspitzen von Vicia Faba) keineswegs und eignet sich also vortrefflich zum mikrochemischen Nachweis wasserlöslicher Albumosen. Denn auch die Osmium-Protalbumose wird leicht gelöst. Noch leichter, schon in der Oxalsäure löst sich das osmirte Pepton. Ueber einige Versuche, die in Osmiumpräparaten erscheinenden Gewebsgranula in der geschilderten Weise zu lösen, vergleiche man die Besprechung der Granulalehre.

Wenn neben der Osmiumsäure Kaliumbichromat oder, wie in der Hermann'schen und Flemming'schen Lösung, Platin und Chrom verwendet worden sind, dann versagt die geschilderte Methode aus begreiflichen Gründen, denn es handelt sich jetzt nicht mehr allein darum,

die Albumose von dem Osmium, sondern auch von dem Chrom und dem Platin zu befreien, wozu andere Reactionen erforderlich sind. Die Granula sind auch nach der Entfernung des Osmium ganz unlöslich in heissem Wasser. Ein Lösungsmittel, das Gewebsschnitte nicht angreift, habe ich für die mit ALTMANN's und HERMANN's Lösung gefällten Albumosegranula bis jetzt nicht gefunden. Das ist auch entbehrlich, da die Fixirung mit Osmiumessigsäure zur Aufsuchung der Albumose in Geweben ausreicht, sobald noch einige andere Fixirungsmittel, wie Alkohol, Pikrinsäure, benutzt werden.

2. Pepton (Amphopepton aus Fibrin, von Prof. SIEGFRIED).

a) Keine Fällung: Salpetersäure, Essigsäure, Chromsäure, Kaliumbichromat, Formaldehyd (10-proc.), FLEMMING'sche Lösung.
b) Fällung in Wasser leicht löslich: Alkohol, Pikrinsäure.
c) Fällung in Wasser unlöslich: Sublimat, Platinchlorid, Osmiumsäure, ALTMANN's Gemisch, HERMANN'sche Lösung.

Es wurde hier nur die Fällung schwach saurer Lösungen geprüft, nach den Erfahrungen an der Deuteroalbumose ist aber zu erwarten, dass Osmiumsäure und ALTMANN's Gemisch alkalische Lösungen nicht ausfällen. Diese würden nur von Sublimat vollständig gefällt werden, denn Platinchlorid (1-proc.) gibt nur schwache, partielle Niederschläge, die bei 10-proc. Platinchlorid auch nicht total werden. HERMANN's Lösung fällt nur unvollständig, ebenso Osmiumsäure und ALTMANN's Gemisch bei saurer Reaction. Die Gefahr, mit Pepton Artefacte zu bekommen, ist also sehr gering.

Der Sublimatniederschlag, der reichlichste und vollständigste von allen, besteht vorherrschend aus zarten Gerinnselchen, in die einzelne grössere Granula eingesprengt sind. Die schwächere Fällung aus 1-proc. Platinchlorid, Osmiumsäure und HERMANN's Gemisch überrascht durch prachtvolle grosse und kleine, isolirte oder in Verbänden sprossähnlich zusammenhängende Granula. Dagegen fällt ALTMANN's Gemisch kleine, knorrige Bröckelchen und Fragmente von granulösem Aussehen, sicher keine Gerinnsel. Der Charakter des Peptons, als eines Granulabildners, tritt also überall hervor, am wenigsten beim Sublimat, das infolge seiner stürmischen Fällungskraft neben Granulis auch Gerinnsel liefert. FLEMMING's Gemisch versagt wohl desshalb, weil seine Osmiunsäure zu verdünnt ist und die Chromsäure überhaupt nicht wirkt. Andere Peptone müssen noch geprüft werden.

3. Protalbumose.

Die Protalbumose nähert sich in ihrem Verhalten gegenüber den Fixirungsmitteln sehr der Deuteroalbumose und wird von allen, die diese fällen, ebenfalls gefällt. Nur Ferrocyankalium mit Essigsäure tritt neu hinzu und giebt mit Protalbumose ein schönes Granulagemisch, in dem sich leicht Berliner Blau erzeugen lässt. Die durch starke (50 Proc.) Salpetersäure entstehende Fällung ist im Ueberschuss löslich, schwache (3 Proc.) dagegen ist ganz wirkungslos. Weniger gleichmässig als bei Deuteroalbumose ist die Fällungsform der Protalbumose, die durch grössere Neigung zur gerinnseligen Abscheidung ihre näheren Beziehungen zum Albumin verräth. Dennoch scheidet sich die

Protalbumose oft in Granulagemischen ab. Aus sauren Lösungen fällt sie in Granulis aus durch Kaliumbichromat oder das ALTMANN'sche Gemisch, während Osmiumsäure allein mehr gerinnselige Aggregate sehr kleiner Granula abscheidet. Bei jeder Reaction erzeugt Chromsäure (0,5) das von der Deuteroalbumose her bekannte Gemisch von Granulis aller Grössen, dagegen sinkt mit FLEMMING's Mischung der Durchmesser der Körnchen. Tannin, Sublimat, Formol, endlich Osmiumessigsäure fällen granulär-gerinnselig, bei saurer Reaction können sich noch recht deutliche und isolirte Granula, auch von verschiedener Grösse ausbilden, zwischen ihnen wird aber doch die Hauptmasse grobgranuläre Gerinnselchen darstellen, die bei schwacher alkalischer Reaction allein noch sich entwickeln. Zwischen Chromsäure und die eben besprochenen Fixirungsmittel schiebt sich Platinchlorid und HERMANN'sche Lösung ein, sie bilden aus Protalbumose entschieden noch Granula, wenigstens bei saurer Reaction, aber diese haben Neigung, sich zu Kettchen und verästelten kleinen Gruppen und schliesslich auch grösseren, sehr grob-granulären Gerinnselchen zusammenzulagern. Aus alkalischen Lösungen werden durch Platinchlorid und HERMANN-sche Lösung derartige Aggregate, keine freie Granula mehr, abgeschieden, zugleich verkleinert sich das Korn etwas. Der Uebergang zur Gerinnselbildung spricht sich auch hierin aus. Dass die Concentrationen von Lösungen und Fixirungsmitteln in denselben Wechselbeziehungen stehen wie bei der Deuteroalbumose, braucht nicht näher geschildert zu werden. Da auch wie dort die Ausfällungen durch die Gruppen c und d (p. 33) in Wasser und Alkohol ganz unlöslich sind, so ist auch die Protalbumose zu denjenigen Eiweisskörpern zu stellen, welche bei der Fixirung leicht Granula geben (Kaliumbichromat, ALTMANN's Gemisch, Chromsäure, FLEMMING's Lösung, Platinchlorid, HERMANN'sche Lösung). Auch schwächere Sublimatlösung (0,5) liefert aus saurer 5-proc. Protalbumoselösung ein gutes Granulagemisch, während 7-proc. Sublimat daraus nur sehr kleine, gerinnselig zusammengehäufte Granula abscheidet.

4. Nucleinsäure.

a) Keine Fällung: stark verdünnte Essig- und Salpetersäure, Osmiumsäure, Kaliumbichromat, ALTMANN's Gemisch, Osmiumessigsäure (mit 1 Proc. Essigsäure).

b) Fällung bei jeder Reaction, in Wasser löslich: Alkohol, Aceton, Pikrinsäure; starke Essigsäure, VAN BENEDEN's Alkohol-Eisessig.

c) Fällung bei jeder Reaction, in Wasser unlöslich:

α) Gerinnsel: Sublimat, Formaldehyd, Jodalkohol, starke Salpetersäure.

β) Granula und chromosomenähnliche knorrige Gebilde: Chromsäure (Fig. 5 *a* u. *b*), Platinchlorid (Fig. 5 *d*), FLEMMING's (Fig. 5 *c*) und HERMANN's Gemisch.

Zu dieser an Hefenucleinsäure gewonnenen Uebersicht sind noch einige Bemerkungen erforderlich. Die Nucleinsäure war entweder in warmem Wasser mit natürlicher saurer Reaction gelöst, die nöthigenfalls durch einige Tropfen 2-proc. Essigsäure verstärkt wurde. Alkalische Lösungen wurden mit 0,2, 0,5-proc. Kali mit 1- und 5-proc. Ammoniakwasser hergestellt und zu Parallelversuchen ebenfalls ange-

säuert. Die alkalische Reaction hemmt hier auch solche Fixirungsmittel, die wie Sublimat eine sehr grosse Fällungskraft besitzen, weil die Nucleinsäure überhaupt schwer fällbar ist. Bei natürlicher saurer Reaction bedarf es schon eines sehr grossen Volumens von Pikrinsäure oder Chromsäure (0,5), von Platinchlorid 1 Proc., damit der Niederschlag bald sich absetzt und nicht bloss als Opalescenz erscheint. Man muss daher bei alkalischer Reaction viel stärkere Concentration anwenden, z. B. 5-proc. Chromsäure, 10-proc. Platinchlorid, um schnell zu wirken. Die schwere Fällbarkeit der Nucleinsäure ist ebenso auch Flemming's und Hermann's Gemisch gegenüber bemerkbar und erschwert die Wirkung von Formaldehyd und Jodalkohol ganz ausserordentlich. Die Essigsäure in stärkeren Verdünnungen, vielleicht bis 5 Proc., wirkt gar nicht, fällt aber mit 10 Proc. schon total, ohne im Ueberschuss wieder zu lösen, schneller wirkt selbstverständlich Eisessig. Jedenfalls ist die Essigsäure in den Verdünnungen, wie sie zu Osmiumsäure oder Flemming's Gemisch zugesetzt wird, kein Fällungsmittel für Nucleinsäure, während sie in van Beneden's Alkohol mit 10 Proc. Eisessig fällt. Ebenso wirkt die Salpetersäure. Durch dieses Verhalten gegen verdünnte Säuren unterscheidet sich die Nucleinsäure wesentlich vom Nuclein, das schon durch die geringste Menge freier Säure (Essigsäure, Salzsäure, Salpetersäure, Oxalsäure) unlöslich ausgefällt wird.

Sehr leicht lösen sich im Wasser die Niederschläge aus Alkohol, Aceton, Pikrinsäure, langsamer die aus Essigsäure. Die mit Alkohol gefällte Nucleinsäure verschwand noch augenblicklich im Wasser, nachdem sie 14 Tage bis 10 Wochen unter Alkohol gestanden hatte. Ebenso verhält sich die in Pikrinsäure aufbewahrte Fällung. Ganz unlöslich in Wasser sind die Fällungen mit Jodalkohol, Formaldehyd und Salpetersäure wohl nicht, aber sie lösen sich doch so wenig und langsam, dass die Fixirungstechnik sie als unlöslich betrachten kann. Selbst die mit Chromsäure und Platinchlorid erzeugten Niederschläge der Hefenucleinsäure sind in heissem Wasser, in stärkerer, ca. 10-proc. Schwefelsäure, nicht ganz unlöslich, ebenso in Anilinwasser, weshalb damit bereitete Farblösungen hier nicht zu verwenden sind, wenn man nicht verunstaltete Bilder haben will. Eine irgendwie bemerkbare Lösung bringt kaltes Wasser auch in vielen Tagen nicht hervor.

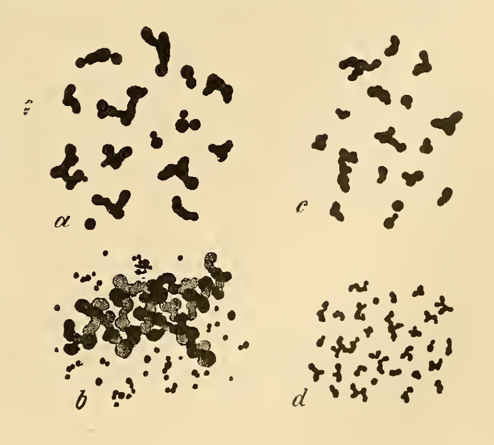


Fig. 5. Hefenucleinsäure, gefällt *a* und *b* mit Chromsäure, *c* Flemming'scher Lösung, *d* 1-proc. Platinchlorid. Der Unterschied der beiden Chromfällungen (*a* u. *b*) beruht darauf, dass die eine (*b*) aus einer viel dünneren (circa 1-proc.) Lösung der Nucleinsäure stammt, weshalb sich viel kleinere Granula gebildet haben; das knäuelartige, verschlungene Aggregat (*b*) würde man auch, nur plumper und grösser, in den anderen Niederschlägen finden können. Die drei anderen Abbildungen (*a*, *c*, *d*) gehören zu ein und derselben Lösung, 3-proc. Nucleinsäure, schwach ammoniakalisch. (Vergr. 1500.)

Typische, feiner oder gröber punktirte Gerinnsel werden gefällt durch Alkohol, Aceton, Sublimat, Formaldehyd, Jodalkohol und Salpetersäure, denen noch dünnere Essigsäure anzureihen ist, während Eisessig schön granulär fällt. Hier scheinen übrigens Schwankungen vorzukommen, bedingt durch die Reaction der Nucleinsäurelösung. Das trifft sicher zu für die unter c, β genannten Mittel, die aus alkalischen Lösungen bei starker Hemmung meistens Gerinnsel fällen, aus sauren Granula. Diese bleiben in 3-proc. Lösungen noch recht klein, sind bald einzeln, bald in Kettchen gelagert und stets reichlich untermengt mit knorrigen, buckeligen, mannigfach gestalteten Gebilden, die an Chromosomen erinnern. Am schönsten und grössten werden diese sonderbaren Formen mit Chromsäure, z. B. 5-proc. Chromsäure, und einer 3-proc. schwach alkalischen Lösungen der Nucleinsäure in Ammoniakwasser (Fig. 5 *a*, *b*). Oft begegnet man auch knäueligen, grossen Fällungsaggregaten, die aus solchen knorrigen Bildungen zusammengesetzt sind. War die Chromsäure schwächer, dann werden ebenso wie mit Platinchlorid (Fig. 5 *d*), Hermann's und Flemming's Gemisch (Fig. 5 *c*) die Granula und die chromosomenähnlichen Körperchen noch kleiner, ohne dass dadurch der Charakter der Fällung als ein granulärer verloren geht. Weitere Varianten aufzuzählen, scheint überflüssig. Man wird schon aus dem Mitgetheilten ersehen, dass die Nucleinsäure ein sehr launischer Körper ist, der wegen seiner schweren Fällbarkeit, schwankenden Fällungsform und begrenzten Unlöslichkeit der Niederschläge schwer zu bemeistern und in bestimmte Regeln einzuordnen ist. Für den Fixirungsvorgang hat das weniger Bedeutung, weil, wie p. 53, 58 gezeigt werden soll, kaum anzunehmen ist, dass freie Nucleinsäure jemals sich in der Zelle ansammeln wird.

Mit der Thymusnucleinsäure konnten nur zwei Fixirungsmittel geprüft werden. Aus einer 5-proc. Lösung in 1-proc. Kali fällte 0,5-proc. Chromsäure nur grobpunktirte Gerinnsel, keine isolirten Granula, eine durch die Reaction und die schwache Concentration der Chromsäure erklärliche Erscheinung. Ebenso vermochte 1-proc. Platinchlorid aus einer 10-proc., stark alkalischen (2 Proc. Kali) Lösung nur Gerinnsel zu fällen und war der Lösung überhaupt nicht gewachsen, die Fällung war nur partiell. Dagegen gab 10-proc. Platinchlorid mit derselben 10-proc. Nucleinsäure sehr schöne grosse (1—2 μ Durchmesser) isolirte Granula (Taf., Fig. 37), die zu den später zu schildernden Chromatophilie- und Imprägnirungsversuchen sich auch desshalb besonders eigneten, weil sie in heissem Wasser, in concentirter Schwefelsäure (10 Minuten wirkend) ganz unlöslich waren. Um Gemische von Granulis und Gerinnseln aus Nucleinsäure zu erhalten, wurde die alkalische 10-proc. Lösung zunächst mit 1-proc. Platinchlorid 24 Stunden stehen gelassen und dann mit 10-proc. total ausgefällt (Taf., Fig. 35, 36).

5. Hämoglobin.

a) Keine Fällung: Essigsäure (im Ueberschuss löslich).
b) Feinpunktirte, plasmatische Gerinnselchen bei jeder Reaction, in Wasser und Alkohol unlöslich: Osmiumsäure, Altmann'sche Mischung, Pikrinsäure, Chromsäure, Sublimat, Platinchlorid (Fig. 6 *f*), Formol, Osmiumessigsäure,

FLEMMING's (Fig. 6 *e*) und HERMANN's Mischung, MÜLLER'sche Lösung (Fig. 6 *c*).

c) Gröber granulirte Gerinnselchen, unlöslich: Salpetersäure (Fig. 6 *d*), Salpetersäure-Alkohol.

d) Granula bei neutraler oder saurer Reaction, in Wasser unlöslich: absoluter und 96-proc. Alkohol (Fig. 6 *a*), Kaliumbichromat (Fig. 6 *b*).

Das Hämoglobin wurde in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst (neutral) oder in 0,2-proc. Kalilauge, durchweg circa 2-proc. Saure Lösungen wurden hier nicht besonders untersucht. Schwachalkalische Lösungen wurden von Osmiumsäure, Kaliumbichromat und ALTMANN's Gemisch zwar langsam, aber doch innerhalb 20 Stnuden gefällt, in derselben Form wie aus neutraler Lösung, nur waren beim Kaliumbichromat die Granula etwas kleiner und neigten auch mehr zur Verklebung zu Kettchen und Gerinnselchen. Alkohol wurde durch die alkalische Reaction stark gehemmt, 96-proc. gab in 4 Tagen gar keine Fällung, absoluter schied nur sehr dürftige schleierig-zarte Gerinnselchen ab, in die einige grosse Granula verstreut eingebettet waren. In neutralen Lösungen erzeugten aber sowohl 96-proc., als auch absoluter Alkohol Granula, die durch ihre mannigfaltige Grösse (0,4—1,5 μ Durchmesser) an die Albumosegranula sich anschliessen,

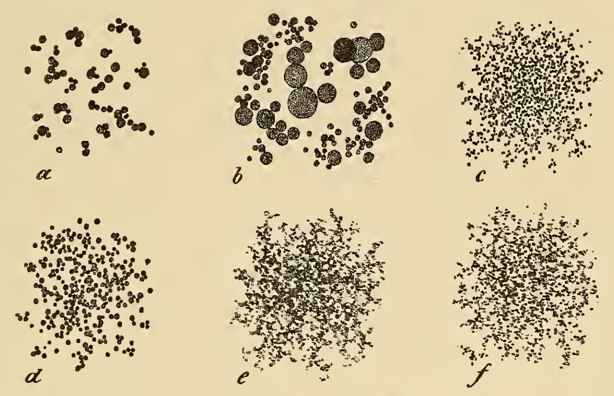


Fig. 6. Hämoglobin, circa 2-proc. in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung; neutral. Verschiedene Fällungsformen: *a* 96-proc. Alkohol, *b* 2,5-proc. Kaliumbichromat, *c* MÜLLER'sche Lösung, *d* 50-proc. Salpetersäure, *e* FLEMMING-sche Lösung, *f* 1-proc. Platinchlorid. (Vergr. 1500.)

aber mehr als diese zur Ketten- und Verbandbildung neigen. Man wird also zwischen isolirten Körnern, die auch hier reichlich vorkommen, solche Aggregate zu erwarten haben (Fig. 6 *a* und Taf., Fig. 1). Die alkoholische Fällung ist nach NENCKI (I, p. 335), der sie als Parahämoglobin bezeichnet, procentisch genau so zusammengesetzt wie das ursprüngliche Hämoglobin, das durch Alkohol nicht zersetzt wird. NENCKI (I, p. 340) bemerkt weiter, dass durch Alkohol gefälltes Hämoglobin in Wasser unlöslich ist, nur darin aufquillt und sonst keine Veränderung erleidet. Jedoch scheinen nicht alle physiologischen Chemiker dieser Ansicht beizustimmen und mehr zu derjenigen HOPPE-SEYLER's zu neigen, der NENCKI's Parahämoglobin nicht für eine chemische Verbindung, sondern ein Gemenge der Zer-

setzungsproducte des Blutfarbstoffes erklärt (vergl. NEUMEISTER IV, p. 149). Hieran würde sich die Frage knüpfen, ob man die grösseren und kleineren Granula der Alkoholfällung als gleichartige Gebilde auffassen könnte oder ob nicht. Ich halte das erstere doch für das Sachgemässere, ohne es freilich beweisen zu können. Sollte NENCKI's Ansicht, mit der wir doch auch noch zu rechnen haben, das Richtige treffen, so würden wir in den verschieden grossen Granulis sichere und chemisch verbürgte Abscheidungen desselben Stoffes vor uns haben, die nur durch ihre Grösse sich zunächst unterscheiden. Sie würden zu färbungstheoretischen Versuchen sehr geeignet sein (Taf., Fig. 1), die übrigens auch durch HOPPE-SEYLER's Annahme nicht gänzlich abgeschnitten sind. Die Granula waren in Wasser unlöslich, aber quollen doch bei längerem Stehen unter Wasser etwas auf und liessen dann bei Differenzirungsfärbungen den Farbstoff etwas leichter fahren, als kurz nach der Fällung, oder wenn sie dauernd unter Alkohol aufbewahrt wurden. In diesem halten sie sich unverändert in Form und färberischen Eigenschaften. Die Hämoglobingranula sind sowohl im Gemisch (Taf., Fig. 2, 3) wie auch die verschiedenen Grössen schon unter einander sehr gut mit Eisenhämatoxylin oder ALTMANN's Säurefuchsin herauszudifferenziren, weniger vortheilhaft, aber doch ausreichend ist die GRAM'sche Methode. In der reinen Alkoholfällung des Hämoglobins wird man aber mit den beiden anderen Methoden sehr schöne Bilder erhalten, die grösseren Granula noch intensiv, also schwarz oder säurefuchsinig gefärbt, die kleineren im letzteren Falle pikringelb, im ersteren durch Contrastfärbung (Safranin, Tropäolin etc.) hervorhebbar (Taf., Fig. 1).

Da die Blutfarbstoffe sehr leicht durch chemische Reagentien zersetzt werden, z. B. auch durch die Fällung mit schweren Metallsalzen, so ist wohl nicht anzunehmen, dass unzersetztes Hämoglobin die gerinnseligen Fällungen bildet, die mit den meisten anderen Fixirungsmitteln erhalten worden sind. Selbst für die granulären Abscheidungen durch Kaliumbichromat (Fig. 6 *b*) kann das zweifelhaft sein. Sicher gilt dies wohl auch für die MÜLLER'sche Lösung, deren Glaubersalzgehalt (1 Proc.) gegenüber das Hämoglobin empfindlicher ist, als die anderen Eiweisskörper. So erklärt es sich, dass MÜLLER'sche Lösung nur etwas grobpunktirte Gerinnselchen (Fig. 6 *c*), Kaliumbichromat allein aber schöne Granula liefert (Fig. 6 *b*). Ein guter Theil der Gerinnselchen wird wohl aus abgespaltenen Globulinen sich zusammensetzen. Für die Morphologie der Fixirung ist das aber belanglos, denn es bleibt die Thatsache unerschüttert, dass ein und derselbe Stoff, Hämoglobin, aus neutraler Lösung bald in schönen Granulis (Fig. 6 *a* und *b*), bald in gröberen (Fig. 6 *d*) oder feinpunktirten (Fig. 6 *c*, *e*, *f*) Gerinnselchen von plasmatischem Aussehen durch die verschiedenen Fixirungsmittel unlöslich gefällt worden ist. Hierzu kommt als besonders wichtig hinzu, dass der Alkohol es ist, der hier unlösliche Granula erzeugt, während er die anderen Granulabildner, Peptone, Albumosen und Nucleinsäure, wasserlöslich fällt.

III. Die Gerinnselbildner.

Ausschliesslich in feinpunktirten Gerinnselchen von dem p. 31 bereits beschriebenen Bau werden gefällt: Albumine, Globuline, Nucleoalbumine und Nuclein. Ferner sind aus der Gruppe der Granulabildner noch anzuschliessen: Hämoglobin und Nuclein-

säure, die von einer grösseren Zahl von Fixirungsmitteln ebenfalls in plasmatischen Gerinnselchen abgeschieden werden, worüber bereits berichtet wurde, Endlich können auch Albumosen in alkalischer Lösung zur Gerinnselbildung neigen, und Sublimat (und Tannin) erzeugt gern aus Granulis und Gerinnselchen zusammengesetzte Niederschläge (p. 34). Diese Ausnahme darf man nicht ausser Acht lassen, wenn es einmal gelten sollte, netzige oder gerüstige Ausfällungen, deren Artefactnatur keinem Zweifel unterliegt, näher zu bestimmen. Die bereits mitgetheilten Reactionen der Granulabildner geben ausreichende Anhaltspunkte, um durch Anwendung mehrerer Fixirungsmittel festzustellen, ob die zu untersuchenden Gerinnselchen aus einem echten Gerinnselbildner bestehen oder nur eine seltenere Abscheidungsform eines Granulabildners sind. Näheres hierüber vergleiche man in dem Abschnitt über die Grundlagen einer mikrochemischen Fixirungsanalyse (p. 57).

1. Serumalbumin als Typus der Gerinnselbildner.

a) Keine Fällung: Essigsäure (im Ueberschuss löslich).
b) Fällung nur aus saurer Lösung, in Wasser und Alkohol unlöslich: Osmiumsäure, Kaliumbichromat, Altmann's Gemisch (Fig. 7 *a*),
c) Fällung bei jeder Reaction, in Wasser und Alkohol unlöslich: Ferrocyankalium und Essigsäure, stärkere Salpetersäure (50-proc.), Salpetersäurealkohol (10 Proc. N_2O_5); Alkohol, Aceton, Pikrinsäure und ihre Gemenge; Tannin, Chromsäure, Sublimat, Platinchlorid (Fig. 7 *b*), Formol, Osmiumessigsäure, Flemming's und Hermann's Gemisch.

1) Einfluss der Reaction auf die Fällungsform ist nicht zu verspüren, da stets Gerinnselchen, niemals Granula gebildet werden. Nur in oft geschilderter Art wird durch alkalische und neutrale Reaction die Fällungskraft der unter b genannten Stoffe ganz unterdrückt, die auch bei äusserst schwach saurer Reaction, wie sie z. B. die wässrige Lösung des käuflichen Serumalbumins hat, nur langsam und sehr dürftig wirken. Ihre volle Kraft entfalten sie auch hier wieder erst bei gut ausgesprochener saurer Reaction. Einige Körper der Gruppe c werden durch alkalische Reaction gehemmt, wie Alkohol, Pikrinsäure, Chromsäure, kurz es kehren hier dieselben Verhältnisse wieder, die schon bei der Deuteroalbumose ausführlich beschrieben worden sind. Ausser in Wasser wurde das Serumalbumin auch in 0,2-proc. Kali gelöst, wodurch eine Umwandlung in Alkalialbuminat nicht zu befürchten war. Um schwach saure Reaction zu erzielen, wurde die wässrige oder schwach alkalische Lösung mit Essigsäure sofort schwach angesäuert, wieder ohne dabei Gefahr zu laufen, dass ein Acidalbuminat entstanden wäre. In 0,2-proc. Milchsäure oder 0,2-proc. Essigsäure wurde auch unmittelbar gelöst.

2) Einfluss der Concentration. Zu so hoher Concentration wie bei der Deuteroalbumose kann man hier nicht aufsteigen, es genügt aber schon der Vergleich einer 1- und einer 4-proc. Lösung in 0,2 KOH, um zu sehen, dass z. B. Platinchlorid (1-proc.; Fig. 7 *b*). Flemming'sche Lösung und Osmiumessigsäure aus beiden Lösungen Gerinnsel von ganz gleichem Aussehen und gleich zarter Punktirung ausfällen. Nähere Untersuchung auf etwa eingeschlossene Granulationen

mit Eisenhämotoxylin oder GRAM oder ALTMANN's Säurefuchsin überzeugt weiter von der vollkommenen Gleichartigkeit der Niederschläge. Vergleicht man damit Fällungen von 1- und 5-proc. Deuteroalbumose in 0,2 KOH durch die 3 eben genannten Fixirungsmittel (Fig. 1. p. 34), so wird man den Gegensatz überzeugend wahrnehmen: hier reine Granula, dort vollkommen granulafreie Gerinnsel. Eine 10-proc. Serumalbuminlösung in 2-proc. KOH wurde von 5-proc. Chromsäure, 7-proc. Sublimat und 10-proc. Platinchlorid, ebenfalls in den eben geschilderten Gerinnselchen, ohne jede Spur freier Granula, gefällt.

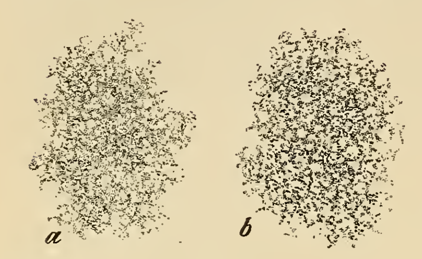


Fig. 7. Gerinnsel aus Serumalbumin, 2-proc., *a* saure Lösung, gefällt mit ALTMANN's Bichromat-Osmiumgemisch, *b* neutrale Lösung in physiologischer Kochsalzlösung, gefällt mit 1-proc. Platinchlorid. In beiden Fällen sind feinpunktirte, plasmatische Gerinnsel von gerüstigem Bau, keine Schaumstructuren entstanden. (Vergr. 600.)

3) Löslichkeit. Keine einzige Fällung ist in Wasser löslich, auch die durch Alkohol und Aceton oder Pikrinsäure nicht, die dagegen in schwachen Alkalien (0.2 KOH) leicht sich lösen. Die Platin- und Chromfällungen sind auch darin unlöslich, ebenso in Jodkalium, das nur die Sublimatfällung augenblicklich hinwegnimmt. Die Osmiumfällung löst sich nach der p. 40 für Deuteroalbumose beschriebenen Methode ebenfalls leicht.

4) Eieralbumin und Alkalialbuminat verhalten sich genau wie Serumalbumin.

2. Serumglobulin.

Das Serumglobulin wird von den Fixirungsmitteln genau so gefällt wie das Serumalbumin, weshalb auf dieses hiermit kurz verwiesen sei. Es wurde auch an schwach sauren und alkalischen Lösungen derselbe Einfluss der Reaction festgestellt, wie dort.

Ein zweites Globulin, dargestellt aus der Krystalllinse, gab keine abweichenden Resultate, als es in alkalischer Lösung mit einigen Fixirungsmitteln behandelt wurde. Seine weitere Uebereinstimmung mit dem Globulin und Albumin des Blutserums erscheint danach selbstverständlich.

3. Casein und Conglutin.

Diese Nucleoalbumine weichen von den Albuminen und Globulinen nur durch ihr Verhalten gegenüber Osmiumsäure ab, von der sie auch in saurer Lösung nicht gefällt werden. Ebensowenig vermag Osmiumessigsäure sie abzuscheiden. Da aber Kaliumbichromat in sauren Lösungen Niederschläge gibt, so ist es nicht zu verwundern, dass dies auch ALTMANN's Gemisch thut. Nur ist dessen Wirkung allein auf Rechnung des Kaliumbichromates zu setzen, was als interessantes Beispiel für die Wirkungsweise der Gemische zu beachten ist.

4. Nuclein.

a) Keine Fällung bei jeder Reaction: Osmiumsäure, Kaliumbichromat, ALTMANN's Gemisch.
b) Gerinnselige Fällung, in Wasser unlöslich: schwache und starke Essigsäure, Salpetersäure, Alkohol, Jodalkohol, Pikrinsäure, Sublimat, Chromsäure, Platinchlorid, FLEMMING's und HERMANN's Gemisch, alle mit Essigsäure versetzten Lösungen, z. B. Osmiumessigsäure (hier wirkt nur die Essigsäure).

Dieser wegen der Zellkerne besonders interessante Körper ist gegenüber allen anderen Eiweisskörpern durch sein Verhalten zu schwachen Säuren gekennzeichnet: er wird davon gefällt und löst sich auch im Ueberschuss nicht. Die mit schwachem Alkali (0,5 Kali) hergestellte 3-proc. Nucleinlösung opalescirt bereits dauernd, sobald man bei Säurezusatz den Neutralitätspunkt eben überschritten hat, und beim geringsten weiteren Zusatz, selbst von sehr verdünnten Säuren, wie 2-proc. Essigsäure, 1-proc. Salzsäure, 1-proc. Oxalsäure, 3-proc. Salpetersäure, erscheint der unlösliche Niederschlag. Gut saure, klare Lösungen von Nuclein sind daher gar nicht herstellbar; um Röthung des Lakmuspapieres zu haben, muss man eine kräftige Opalescenz sich gefallen lassen. Sie hindert keineswegs die Beobachtung, denn durch das Fixirungsmittel neu entstehende Niederschläge sind von der Säuerungsopalescenz sicher zu unterscheiden.

Die geschilderte Eigenthümlichkeit des Nucleins dürfte auch in der Zelle sehr wichtig werden, weil bei freier Säure das etwa gelöste Nuclein sofort ausfallen muss. Die Fixirungsmittel werden daher nur in alkalischen Zellen gelöstes Nuclein antreffen, und deshalb ist es besonders wichtig, die Fällung der alkalischen Lösungen zu studiren. Die Reaction hemmt auch hier viele Fixirungsmittel, nur nicht so stark, wie bei der Nucleinsäure, sehr gehemmt ist das sonst so kräftige Sublimat (7-proc.), der Alkohol; gänzlich unterdrückt scheint das Formaldehyd (10-proc.) zu werden, das auch schwach saure Lösung fast gar nicht fällt. Ebenso wie bei Nucleinsäure sind auch für das Nuclein grosse Volumina der Fixirungslösungen empfehlenswerth.

Fig. 8. Nuclein aus Hefe, 3-proc. in 0,5 KOH, mit FLEMMING'scher Lösung gefällt; rein-gerinnselig. (Vergr. 1500.)

Aus allen Lösungen, auch nicht zu lange stehenden alkalischen, fällen alle Fixirungsmittel typische, feiner oder gröber punktirte Gerinnsel (Fig. 8) und schollige Massen aus, die mit denen des Albumins übereinstimmen. Wenn aber eine alkalische Lösung vielleicht 1 Tag oder länger steht, so zersetzt sich leicht das Nuclein in Nucleinsäure und Albumin. Die eingetretene Zersetzung ist am Umschlag der Reaction bemerkbar, sie ist sauer geworden durch die freie Nucleinsäure. Eine solche, ca. 20 Stunden alte saure Lösung des Nucleins in 0,2 Kali war es, die ich früher (II, p. 770) untersuchte und granulär durch Chromsäure und FLEMMING's Gemisch ausfällen konnte, nur deshalb, weil freie Nucleinsäure abgespalten worden war und der Albuminantheil in zarten Flöckchen und Gerinnselchen die vorherr-

schend granuläre Fällung verunreinigte. Verhindert man diese Zersetzung des Nucleins in seine beiden nächsten Componenten, so wird es stets nur in Gerinnseln abgeschieden werden. Da das Nuclein im Wasser nur etwas quillt, aber nicht sich löst, so sind auch alle durch die Fixirungsmittel erzeugten Niederschläge in Wasser unlöslich. Nur ganz frisch mit Alkohol aus alkalischer Lösung gefälltes Nuclein löst sich recht gut in Wasser (vgl. auch Kossel, III, p. 291), coagulirt aber bald.

Kapitel IV. Die Fällungsform der Eiweisskörper in Gemischen.

Die Erfahrung, dass zwei Gruppen von Eiweisskörpern, Granula- und Gerinnselbildner, durch die Fixirungsmittel sich unterscheiden lassen, würde zwar an und für sich ganz beachtenswerth sein, sie würde aber die feinere Analyse fixirter Präparate wenig beeinflussen, wenn sie sich nur auf die Fällung einfacher Lösungen bezöge oder wenn sich ergäbe, dass aus Gemischen von Eiweisskörpern die einzelnen Bestandtheile nicht gesondert, in der ihnen eigenen Form, abgeschieden würden. Ich habe bereits früher (I, p. 680, II, p. 771) kurz gezeigt, dass *die beiden Gruppen der Granula- und Gerinnselbildner auch bei der Fällung aus Gemischen ihre specifische Fällungsform beibehalten und dass es leicht gelingt, Granula in Gerinnsel durch einmalige Fällung geeigneter Gemische einzubetten.* Erst durch diese Thatsache gewinnt die ganze Unterscheidung Bedeutung für den Fixirungsvorgang, bei dem doch stets mit der Ausfällung von zusammengesetzten Eiweisslösungen gerechnet werden muss. Die künstlichen Gemische entsprechen selbstverständlich nicht vollkommen den intercellularen Gemischen, aber sie ahmen sie doch bis zu einem gewissen Grade nach und können daher auch zum Verständniss des Fixirungsvorgangs wesentlich beitragen. Endlich bringen sie den Unterschied zwischen Granula- und Gerinnselbildnern noch überzeugender zur Anschauung (Taf., Fig. 2—6, 9, 10) als die isolirten Fällungen. Bei der Herstellung solcher Mischungen und bei der Wahl der Fixirungsmittel, von denen man eine brauchbare Fällung erwartet, hat man alles das zu beachten, was über Einfluss der Reaction und Concentration bei der Deuteroalbumose, auf die hier zu verweisen ist, vorgebracht wurde. Die einzelnen Bestandtheile der Mischungen werden isolirt gelöst und dann im Messcylinder gemengt. Will man alkalische Reaction haben, so löst man den Gerinnselbildner in schwacher Kalilauge (0,2-proc.) und neutralisirt vor dem Zugiessen die schwachsauren Lösungen der Deutero- und Protalbumose, um ganz klare Mischungen zu erhalten. Die wässrige neutrale Lösung des Hämoglobins kann man ohne weiteres beimischen. Für saure Mischungen löst man entweder unmittelbar in Säuren, empfehlenswerther aber ist es, die alkalischen Lösungen der Gerinnselbildner mit Essigsäure zu überneutralisiren.

Mit *Alkohol* kann man nur in Gemischen mit Hämoglobin Granula erzeugen, am besten bei schwach saurer Reaction; die *neutralen Fixirungsmittel* geben mit Deuteroalbumose nur in sauren Gemischen Granula. Unter denjenigen Fixirungsmitteln, die bei jeder Reaction Albumosegranula geben, nehmen die erste Stelle ein:

Platinchlorid, HERMANN'sche und FLEMMING'sche Lösung, während Chromsäure (0,5-proc.) durch freies Alkali doch merklich gehemmt ist. Sublimat ist aus den früher (p. 34) erörterten Gründen weniger geeignet, giebt aber doch auch zuweilen sehr gute Bilder (Taf., Fig. 10).

Die quantitative Zusammensetzung der Gemische würde schwanken können einmal im absoluten Gehalt von Granula- und Gerinnselbildnern und zweitens in dem Verhältniss zwischen beiden. Man könnte sich nach einigen Analysen natürlicher Objecte richten, so enthält Blutserum ca. 7 Proc. Gesammteiweiss (Albumin und Globulin), das Hühnereiweiss nahezu 20 Proc.; das Plasmodium von Aethalium septicum (J. REINKE u. RODEWALD, I, p. 54) bestand zu etwa 36 Proc. seines Trockengewichtes aus Eiweissstoffen, die vielleicht 8—9 Proc. des Frischgewichtes ausmachen würden. Man würde also in der Nachahmung der natürlichen Objecte einen weiten Spielraum haben und die Lösungen sicher so concentrirt wie möglich machen können. Wenn man 0,5—4 Proc. vom Gerinnselbildner löst, 1—5 Proc. vom Granulabildner, so werden solche Gemische eher zu niedrig, als zu hoch sein. Es würde ja sehr leicht sein, mit 40-proc. Albumose unzählige Granula aller Grössen in geeignete Gerinnsel einzubetten, überzeugender tritt aber die specifische Fällungsform in solchen Gemischen hervor, die nicht so überladen sind. Das Verhältniss der beiden Componenten kann man beliebig wählen, man nehme mehr vom Granulabildner, wenn man recht dicht eingestreute Granula haben will, mehr vom Gerinnselbildner, wenn man das Gegentheil wünscht. Für Controlversuche empfiehlt es sich, doppelt so viel vom Granulabildner zu nehmen, als vom Gerinnselbildner.

Die frei gefällten Niederschläge lassen bei stärkster Vergrösserung oft schon ungefärbt die eingesprengte Granula erkennen, schöner treten sie durch Färbung hervor. Man erhält, wie schon erwähnt, mit Eisenhämatoxylin, GRAM, ZIEHL's Tuberkelfärbung, ALTMANN's Säurefuchsin-Pikrinalkohol prachtvolle Doppelfärbungen. Stets entfärbt sich das Gerinnsel zuerst (Taf., Fig. 2—6, 9, 10) und ist nun, wenn nöthig, einer zweiten Contrastfärbung zugänglich (Taf., Fig. 3, 9, 10).

Man wird an solchen gefärbten Mischungen noch zweierlei zu beachten haben. Erstens sind die Granula meistens etwas grösser noch, als eine gleichprocentige Lösung des Granulabildners allein gegeben haben würde, und zweitens liegen sie nicht gleichmässig verstreut im Gerinnsel, sondern sind in kleinen und grösseren Nestern in dieses eingesprengt. Die Grössenzunahme ist leicht zu erklären durch die colloidalen Eigenschaften des Gerinnselbildners, der hier genau so wirkt wie eine Gummi-Lösung, die man zur Verlangsamung der Krystallisation und zur Erzielung schöner Sphaerokrystalle anorganischen Salzen beimengt.

Die Anhäufung in Nestern, die bald nur wenige Körnchen, bald Hunderte aller Grössen enthalten, erklärt sich wohl aus der ungleichen Ausfällung. Die Gerinnselbildner werden schneller ausgefällt als die Granulabildner und schliessen deren langsamer sich abscheidende Lösung in sich ein. Dabei muss es vorkommen, dass die Gerinnsel sich zu grösseren Klumpen und Ballen zusammenschieben, die eine gleichmässige Diffusion des Granulabildners und des Fixirungsmittels nicht mehr gestatten. Es entstehen Stauungen innerhalb kleinerer oder grösserer Gerinnsellacunen, in denen sich die Granulanester lang-

sam abscheiden. Aus 80 Mischungen, die geprüft wurden, seien folgende noch besonders hervorgehoben.

1. Gemische von zwei Eiweisskörpern der gleichen Gruppe.

Mischungen zweier sich so nahe stehenden Granulabildner, wie Deutero- und Protalbumose, oder zweier Gerinnselbildner, wie Albumin und Globulin, oder eines dieser beiden und Casein gestatten keine färbungsanalytische Differenzirung der beiden Componenten. Beispiele hierfür näher zu schildern, ist wohl unnöthig. Dagegen eignet sich das Hämoglobin infolge seiner Doppelnatur sehr zu Mischungsversuchen, die je nach dem Fixirungsmittel bald eine Doppelfärbung der beiden Bestandtheile gestatten, bald versagen müssen.

Mischung I. Circa 2 Proc. Hämoglobin + 4 Proc. Deuteroalbumose, in Wasser gelöst, eben sauer: Osmiumsäure (1-proc.), Chromsäure (0,5-proc.) und Altmann's Gemisch hatten das Hämoglobin gerinnselig, die Albumose granulär abgeschieden; die Chromsäure allerdings nur in sehr kleinen Körnchen, die sorgfältiger Färbungsdifferenzirung bedurften. Hier war es also leicht, den Antheil zu bestimmen, den jeder der beiden Gemischbestandtheile am Aufbau des Niederschlages hatte. Kaum ausführbar würde dagegen die mikroskopische Analyse der Kaliumbichromatfällung sein. Neben Einzelgranulis aller Grössen würden nun auch kurze Kettchen oder verästelte Verbände gröberer Granula erscheinen, die etwa eben so gross wären wie die mittleren der frei dazwischen liegenden. Hätte man mit Eisenhämatoxylin oder mit Säurefuchsin-Pikrin mittelstark entfärbt, so würden sowohl zahlreiche isolirte, als auch zahlreiche Granula der Aggregate noch intensiv gefärbt, alle anderen von geringerem Durchmesser farblos sein. Es würde oft unmöglich sein, zu bestimmen, ob die Granula aus Albumose oder aus Hämoglobin bestehen. Alkohol, der nicht besonders geprüft wurde, würde nur das letztere in unlöslichen Granulis gefällt haben.

Mischung II. 2 Proc. Hämoglobin + 2 Proc. Serumalbumin in 0,7 Proc. Kochsalz, eben sauer: wurde vergleichend gefällt mit Alkohol, 50-proc. Salpetersäure, 1-proc. Platinchlorid, 0,5-proc. Chromsäure, Flemming's Lösung, 1-proc. Osmiumsäure, Müller'scher und Altmann'scher Lösung, 0,5-proc. Pikrinsäure, 7-proc. Sublimat. Leider fehlt in dieser Serie reines Kaliumbichromat, das nach anderen Erfahrungen, z. B. auch nach voriger Mischung schöne Hämoglobingranula in das Albumingerinnsel eingebettet haben würde, während die Müller'sche Lösung nach Früherem (p. 46) nur etwas grob punktirte Gerinnsel geben konnte. So bleibt von den 10 verwendeten Fixirungsmitteln nur der Alkohol als Erzeuger von Hämoglobingranulis übrig. Diese waren in der That sehr schön und zahlreich in die Albumingerinnsel eingestreut und liessen sich durch Eisenhämatoxylin und Tropäolinnachfärbung oder mit Säurefuchsin-Pikrin prachtvoll herausheben (Taf., Fig. 2 und 3).

In den granulafreien, feinpunktirten Gerinnselchen der übrigen 9 Fällungen war weder frisch noch gefärbt das Albumin vom Hämoglobin zu unterscheiden. Das Korn der plasmaähnlichen bald lockeren, bald dichter gerüstigen oder netzigen Niederschläge schwankte zwar etwas, war aber so gering, dass selbst die so überaus leistungsfähige

Eisenhämatoxylinfärbung versagte. Nur in den Fällungen mit Salpetersäure oder MÜLLER'scher Lösung vermochte sie eine leichte Differenz aufzudecken, wenn sehr subtil entfärbt wurde. Die länger schwarz bleibenden, etwas gröber punktirten Theile stammten vom Hämoglobin.

Gemische mit Nucleinsäure lassen sich nicht herstellen, weil sie Albumine und Albumosen als nucleoalbuminähnliche Verbindungen ausfällt, die in schwachen Alkalien löslich sind (ALTMANN, V, p. 525). So fällte wässrige, deutlich saure Lösung der Hefenucleinsäure (2-proc.) eine 5-proc. Albumoselösung (vergl. auch MILROY, I, p. 311—317) und ebenso eine angesäuerte 2-proc. Serumalbuminlösung. Im ersten Falle waren unlösliche Granula, im letzteren ebensolche, gleichmässige Gerinnsel entstanden, die natürlich keine färbungsanalytische Trennung der chemisch vereinigten Componenten gestatteten. Wurde eine alkalische Albuminlösung mit wässriger Nucleinsäure vermengt, so blieb sie zwar klar und liess sich durch Chromsäure oder Platinchlorid ausfällen. Das hierbei entstehende Gerinnsel war aber gleichartig, grob punktirt, enthielt keine eingesprengten Granula aus Nucleinsäure. Sättigte man die wässrige Nucleinsäure nicht vollständig mit Albumose, so trübte sich die Lösung nicht, weil die neu entstandene Verbindung im Ueberschuss der Nucleinsäure gelöst blieb. Wurde jetzt mit Chromsäure oder Platinchlorid gefällt, so setzte sich doch nur eine gleichartige, mehr oder weniger granuläre Fällung ab, die auch färbungsanalytisch nicht in die Componenten zu zerlegen war, sondern die Eigenschaften der Nucleinsäure beibehalten hatte, d. h. mit saurer Farbe in wässriger Lösung sich gar nicht färbte (vergl. später).

2. Gemische von Granula- und Gerinnselbildnern.

An erster Stelle würden hier die schon besprochenen Gemische mit Hämoglobin zu nennen sein, das ja die Eigenschaften beider Gruppen in sich vereinigt. Es würden sich noch einige zweigliedrige Mischungen anschliessen, die Prot- oder Deuteroalbumose und einen beliebigen Gerinnselbildner enthalten, und endlich würden vielgliedrige Lösungen zu folgen haben.

1) Zweigliedrige Mischungen.

Mischung III. 5 Proc. Deuteroalbumose + ca. 0,8 Proc. Serumalbumin, in 0,2-proc. Milchsäure gelöst, Reaction stark sauer, gefällt mit 1-proc. Osmiumsäure, den Lösungen von FLEMMING, ALTMANN und MÜLLER. Alle 4 erzeugten in kurzer Zeit schöne Niederschläge mit reichen Granulis in den Albumingerinnseln.

Mischung IV. 2 Proc. Deuteroalbumose + 0,8 Proc. Serumalbumin, letzteres in 0,2-proc. KoH gelöst und dann mit Essigsäure übersäuert, so dass die Mischung ca. 4 Proc. Säure enthielt; gefällt mit ALTMANN's Gemisch (Taf., Fig. 5) und 1-proc. Platinchlorid, die beide prachtvolle Bilder geben, zahlreiche Granula aller Grössen im plasmatischen Gerinnsel des Albumins.

Mischung V. 2—3 Proc. Deuteroalbumose + ca. 1 Proc. Serumalbumin, in 0,2-proc. KOH gelöst, deutlich alkalisch, gab mit ALTMANN's Gemisch natürlich keine Fällung, wohl aber mit: 1-proc. Platinchlorid, HERMANN's und FLEMMING's Lösung, Alkohol, 4-proc. Formaldehyd. Die beiden letztgenannten hatten keine herausfärbbaren Granula erzeugt, weil die Albumosefällung mit Alkohol in Wasser sofort wieder löslich war und das Formol durch die alkalische Reaction gehemmt

wurde und nur gerinnselig die Albumose abschied. Die drei übrigen Fixirungsmittel hatten schöne Granula in das Albumingerinnsel eingelagert, die schönsten und grössten das Platinchlorid (Taf., Fig. 4) und, ihm wenig nachgebend, die HERMANN'sche Lösung. Auch FLEMMING's Flüssigkeit gab noch sehr schöne und granulareiche Bilder, nur war der Durchmesser der Granula etwas geringer als bei den anderen.

Mischung VI. 2,5 Proc. Deuteroalbumose + 0,5 Proc. Serumalbumin, wie vorige alkalisch, gefällt mit FLEMMING's Lösung und mit 7-proc. Sublimat; die erstere lieferte wieder sehr schöne, mittelgrosse Granula, das letztere gab auch ganz gute Bilder, nur nicht so granulareiche, weil die Deuteroalbumose zum Theil gerinnselig ausgefällt worden war. Mit Eisenhämatoxylin und nicht zu langer Differenzirung durch den Eisenalaun gelingt es, viele schwarze Albumosegranula verschiedener Grösse in dem durch Tropäolin oder Safranin nachgefärbten Albumingerinnsel sichtbar zu machen.

Alkalische Mischungen von Deuteroalbumose und Serumalbumin wurden noch in grosser Zahl und wechselnder Zusammensetzung mit den bereits genannten und anderen Fixirungsmitteln gefällt, ohne irgendwelche Abweichungen. Statt des Serumalbumins kann man auch Paraglobulin oder Casein als Gerinnselbildner mit der Deuteroalbumose vereinigen, wiederum ohne andere als die bisher mitgetheilten Resultate.

Mischung VII. Protalbumose 2,5 Proc. + Serumalbumin 1 Proc., schwach alkalisch, gefällt mit Alkohol, 0,5-proc. Sublimat, den Mischungen FLEMMING's und ALTMANN's, von denen die letztere infolge der alkalischen Reaction keinen Niederschlag hervorbrachte, abgesehen von einigen sehr langsam sich abscheidenden unbedeutenden Gerinnselchen. Präparate der Alkoholfällung enthielten infolge der Wasserlöslichkeit der abgeschiedenen Protalbumose keine Granula. Diese waren in reichlicher Menge in den gerinnseligen Niederschlag der FLEMMING-schen Lösung eingesperrt und liessen sich durch Eisenhämatoxylin (Taf., Fig. 9), die GRAM'sche Färbung und das Säurefuchsin-Pikrin-Verfahren ALTMANN's gleichmässig schön hervorheben. Wiederum ein wichtiger Umstand für die Färbungstheorie, da hier dieselben Körperchen saure und basische Farbstoffe im Sinne EHRLICH's gleich gut aufnahmen und das eine Mal fuchsinophil, das andere Mal gentianophil sich verhielten. Die Sublimatfällung (Taf., Fig. 10) gestattete mit Eisenhämatoxylin eine schöne Hervorhebung der Granula, die aber hier nicht so dicht eingestreut waren wie in die FLEMMING-Fällung. In Gerinnsel von Serumglobulin, Casein und Eieralbumin liessen sich Protalbumosegranula ebenso gut einlagern.

2) Mehrgliedrige Mischungen, zunächst mit 1 Granulabildner und 2 Gerinnselbildnern oder umgekehrt, bestätigten das, was über die Mischungen zweier gleichartigen Eiweisskörper bereits gesagt wurde. So war es z. B. nicht möglich, bei Mischung VIII (Deuteroalbumose 5 Proc. + Casein 1 Proc. + Serumalbumin 1 Proc., alkalisch) in der mit FLEMMING'scher Lösung erzeugten Fällung die beiden Gerinnselcomponenten, Casein und Serumalbumin, färbungsanalytisch zu veranschaulichen. Die Albumosegranula waren wieder typisch ausgestaltet. Die Lösungen ALTMANN's und MÜLLER's, ferner 1-proc. Osmiumsäure hatten wegen der alkalischen Reaction erst nach 2—3 Tagen sehr dürftige Gerinnselchen ohne Granula abgeschieden. Salpetersäure (50-proc.) gab, da sie die Deuteroalbumose nicht fällt,

nur Casein-Albumingerinnsel, die nicht in ihre Bestandtheile durch die Färbung zu zerlegen waren.

Michung IX, mit ca. 1 Proc. Serumalbumin, 1 Proc. Hämoglobin, 1,5 Proc. Protalbumose, schwach alkalisch, musste mit Alkohol Hämoglobingranula, eingebettet in Albumingerinnsel, geben, mit Chromsäure oder Flemming's Lösung dagegen Albumosegranula, eingebettet in ein Gerinnsel aus Serumalbumin und Hämoglobin. In der That war dies der Fall. Die Alkoholfällung liess nach Säurefuchsin-Pikrinalkohol theils isolirte, theils zu Kettchen und kleinen Häufchen vereinigte, rothgefärbte Granula aus Hämoglobin in dem Gerinnsel hervortreten. Da die alkalische Reaction den Alkohol etwas hemmt und ausserdem der Hämoglobingehalt kein besonders günstiger war, so waren die Granula nur klein bis mittelgross, aber doch sehr schön. Ganz prachtvolle Präparate lieferte die Eisenhämatoxylin-Färbung, mit der die Hämoglobingranula sich intensiv schwarz gegen das durch Tropäolin nachgefärbte Gerinnsel herausheben liessen.

Die Chromsäure, durch die alkalische Reaction stark gehemmt, hatte nur minimale Granulationen erzeugt, während Flemming's Lösung wieder wahre Musterpräparate herzustellen gestattete, die Albumosegranula in dem aus Hämoglobin und Albumin zusammengesetzten, aber durch die Tinction nicht weiter zerlegbaren, gleichmässigen Gerinnsel.

Sublimat (0,5-proc.) hatte weniger günstig gefällt, die Granulationen aus Protalbumose waren so klein, dass sie selbst mit Eisenhämatoxylin nur als winzige schwarze Punkte erschienen. Die Mischungen Altmann's und Müller's hatten wegen der Reaction versagt.

Mischung X mag als letztes Beispiel zeigen, dass auch aus zusammengesetzteren Mischungen als den bisher besprochenen die Granulabildner in typischer Form ausgefällt werden. Die Mischung enthielt 4 Gerinnselbildner, je 0,7 Proc. Serumalbumin, Eieralbumin, Serumglobulin und Casein, und 2 Granulabildner, circa 2 Proc. Hämoglobin und etwas über 2 Proc. Deuteroalbumose. Die Bestandtheile wurden alle einzeln gelöst, und zwar Serumalbumin und Eieralbumin in Wasser, die beiden anderen Gerinnselbildner in 0,1-proc. Natronlauge, Hämoglobin und Albumose in Wasser. Es wurden zunächst vereinigt Serumalbumin und -globulin, die Mischung blieb klar, dann folgten nach einander, ohne Trübung der Lösung, Eieralbumin, Casein und Hämoglobin. Beim Hinzutropfen saurer Albumoselösung trübte sich das Gemisch zwar etwas, wurde aber durch etwas 0,1-proc. NaOH wieder geklärt. Hätte man deutlich alkalische Reaction beibehalten wollen, so würde man eine ganz klare Lösung erhalten haben. Da aber eben saure Reaction günstigere Resultate versprach, so wurde der Rest der Albumoselösung ohne weiteres zugegossen. Die fertige Mischung sah trüb-röthlich aus und zeigte unter dem Mikroskop zahlreiche feine Gerinnselfragmente, die aber selbst in 2 Stunden nicht zu einem wirklichen Niederschlag sich absetzten, sondern schweben blieben. Ein kleiner Theil der Gerinnselbildner war also schon vor dem Zugiessen der Fixirungsmittel ausgeschieden. Hierdurch wurde aber der ganze Erfolg der Mischung nicht beeinträchtigt. Gefällt wurde mit 12 Fixirungsmitteln, die Niederschläge wurden mit Eisenhämatoxylin und mit Altmann's Säurefuchsin-Pikrin analysirt. Die saure Reaction der fast neutralen Mischung war noch zu schwach für eine kräftige Wirkung von Müller'scher und Altmann'scher Lösung, die beide nur dürftige Gerinnsel gaben, keine kräftigen, schnell sich bildenden

Niederschläge. Osmiumsäure gab in der That schöne Granula in reichlichen Gerinnseln, an deren Aufbau sich das Casein nicht betheiligte; jedoch liegt hier wohl nur eine secundäre Wirkung vor, da die Reaction des Gemisches die Fällungskraft der Osmiumsäure stark herabdrücken musste. Keine Granula gaben 0,3-proc. Pikrinsäure, 4-proc. Formaldehyd, letzteres theils gehemmt durch die Reaction, theils wohl zu schwach in der Concentration. Auch 50-proc. Salpetersäure hatte, wie erwartet wurde, keine Granula gebildet, im Gerinnsel aber liessen sich mit Eisenhämatoxylin etwas gröber gekörnte Bestandtheile, die dem Hämoglobin angehörten, deutlich unterscheiden.

Alkohol, 96-proc. und absolut, hatte das Hämoglobin granulär gefällt in der schon oft beschriebenen Form, es war in einem wahrscheinlich 4-gliedrigen Gerinnsel eingebettet; die Deuteroalbumose des Gemisches kam gar nicht zum Vorschein, sie war durch das Spülwasser gelöst. Sublimatgranula waren mit Eisenhämatoxylin schön nachzuweisen, sie bestanden aus Albumose, das Gerinnsel war 5-gliedrig, denn zu den 4 eigentlichen Gerinnselbildnern trat noch das Hämoglobin hinzu. Eine färberische Unterscheidung dieser 5 Componenten war nicht möglich. Ebenso reich zusammengesetzt und ebenso wenig analysirbar waren die Gerinnsel, in die die Flemming'sche Lösung, 0,5-proc. Chromsäure und 0,1-proc. Platinchlorid ihre Granula eingehüllt hatten. Am kleinsten waren die vom Platinchlorid stammenden, was bei dessen geringer Menge (0,1 Proc.), nicht zu verwundern ist. Die schönsten hatte wieder die Flemming'sche Lösung geliefert.

Die Albumosegranula und diejenigen aus Hämoglobin (Alkoholfällung) stimmten in ihrer Färbbarkeit ganz überein, ebenso in der kugeligen Form, nur ihre Gruppirung war verschieden, die ersteren lagen isolirt, einzeln oder in Nestern, die Hämoglobingranula dagegen neigten zur Bildung von Kettchen und anderen Aggregaten. Würde man, wie das jetzt ja oft geschieht, die Färbungseigenschaften den Ausschlag geben lassen, so müsste man beide Granulasorten als gleichwerthige Bildungen zusammenwerfen. Hätte man mit Säurefuchsin-Pikrin gefärbt, so würde man sie als fuchsinophile Granula vereinigen; hätte man mit Eisen-Hämotoxylin gearbeitet, so würde man, da sie so schwer die schwarze Farbe fahren lassen, sie sicher nicht bloss für harmlose Ausfällungen halten mögen.

3. Einige andere Fällungsversuche.

1) Secundäre Einlagerung von Granulis in Gerinnsel. Schon in einer früheren Mittheilung (II, p. 774) wurde gezeigt, dass es noch auf andere Weise gelingt, Deuteroalbumosegranula in Gerinnsel einzulagern, indem man diese zunächst durch Fällung einer einfachen Lösung darstellt, gut auswäscht und dann auf dem Filter eine Albumoselösung durchfiltrirt. Die mit ihr imprägnirten Gerinnsel werden dann in Fläschchen mit Altmann's Chromosmiumgemisch nachfixirt. So gelang es, Granula aus Deuteroalbumose in Gerinnsel aus Serumalbumin (mit Alkohol oder Sublimat), Serumglobulin (Alkohol, Chromsäure) oder Hämoglobin (Chromsäure) nachträglich einzubetten (Taf., Fig. 6). Derartige Versuche wurden nicht fortgesetzt, weil das Wesentliche schon durch die ersten hinreichend erledigt war und weil anderseits die Bilder doch noch schöner und einheitlicher werden durch Fällung der Gemische. Dem Fixirungsvorgange stehen aber

sicher diese Imprägnirungsversuche oft noch näher, da das fertige Gerinnsel gewissermaassen die gerüstig oder irgend wie ausgeformten Protoplasmatheile nachahmt, die von dem mit Eiweisskörpern beladenen Zellsaft umspült werden.

2) Fällung bakterienhaltiger Eiweisslösungen. Eine ca. 1-proc. Lösung von Serumalbumin in 0,2 KOH wurde mit Bakterien aus Reinculturen reichlich vermengt und nun durch FLEMMING'sche Lösung gefällt. Die Bakterien waren jetzt in dem Gerinnsel überall eingestreut. Es liegen drei Versuche vor. Im ersten waren Eiterkokken (Staphylococcus aureus) und Choleravibrionen, im zweiten ausser diesen beiden noch Typhus- und Milzbrandbakterien zugesetzt. Der dritte Versuch endlich wurde mit einer Mischung aus Serumalbumin, Deuteroalbumose, Eiterkokken und Choleravibrionen ausgeführt. Gefärbt wurde mit GRAM, Eisenhämatoxylin und Säurefuchsin-Pikrinalkohol. Mit den beiden letzteren waren die auf der Taf., Fig. 7, 8 dargestellten Präparate des ersten Versuches behandelt. Man sieht in dem feinen Gerinnsel des Albumines nur noch die Staphylokokken, die granulaartig daraus hervortreten. Die Choleravibrionen, die wie bei der GRAM'schen Färbung, auch bei den beiden anderen Methoden schneller sich entfärben, waren vollkommen unsichtbar. Nur dort, wo das Hämatoxylin durch den Eisenalaun weniger ausgezogen war, traten auch die blasser gefärbten Choleravibrionen hervor. Dieselben Resultate gab die zweite Mischung mit 4 Bakterien, von denen bei genügender Differenzirung (GRAM, Eisenhämatoxylin) nur die Kokken und die Milzbrandbacillen gefärbt waren.

Am wichtigsten scheint mir der dritte Versuch; er zeigte, dass die Deuteroalbumosegranula, die ja in ihrer Grösse und Gestalt vollkommen mit Kugelbakterien übereinstimmen, sich ebenso langsam entfärbten wie die Staphylokokken. Von ihnen waren ja viele Granula durch ihren grösseren Durchmesser leicht zu unterscheiden, die kleineren gelang es aber nicht mehr als solche zu erkennen. Eine Verwechslung der Kokken und der Granula unter einander war nicht zu vermeiden. Da auch die Granula oft paarweise, als Zwillinge an einander hängen, so werden durch sie auch Theilungsbilder à la Kokken täuschend nachgeahmt.

Die pathologische Bakteriologie wird sich mit diesen Resultaten abzufinden haben, aus denen ich nicht etwa folgern möchte, dass es keine Bakterien in den Geweben gibt. Zur Vorsicht dürften die Versuche aber doch besonders diejenigen mahnen, die hinter jedem gefärbten Körnchen und Kügelchen in pathologischen Präparaten Mikroorganismen wittern möchten. Mit Leichtigkeit würde man übrigens in zweifelhaften Fällen sich von der Bakteriennatur der Einschlüsse überzeugen können. Bakterien müssen bei jeder beliebigen Fixirung unverändert in ihrer Gestalt bleiben, während nur gewisse Fixirungsmittel granuläre Ausfällungen geben können. Man müsste also dasselbe Object einer ganzen Reihe von Fixirungen unterwerfen. Das führt zum nächsten Kapitel über.

Kapitel V. Ueber die Möglichkeit einer mikrochemischen Fixirungsanalyse.

Der Leser, der bis hierher gefolgt ist, wird vielleicht ausrufen: Wozu der Lärm? Wie sollen Versuche an Albumosen, Albuminen und

dergleichen, aus denen doch sicherlich Kern und Protoplasma nicht allein bestehen, uns über deren Bau und Fixirung aufklären können? Er wird vielleicht noch hinzufügen, dass die geformten feineren Bestandtheile des Protoplasmas und Kernes, die in den letzten 10—20 Jahren beschrieben worden sind, mit den hier geschilderten Kunstproducten nichts zu thun haben. Es muss daher gezeigt werden, wie sich die gewonnenen Erfahrungen für die Zellforschung zur mikrochemischen Analyse der Zelle weiter verwerthen lassen. Wenn das zunächst nur für zwei Körpergruppen aussichtsvoll erscheinen wird, so wäre damit doch schon etwas erreicht. Die Gerinnselbildner von einander zu trennen, wird vorläufig nicht glücken. Dagegen ist der Nachweis von Albumose und reiner Nucleinsäure wohl möglich und hier zunächst durch eine Aufstellung des Verfahrens vorzubereiten. Sollte es nicht gelingen, Albumose fixirungsanalytisch nachzuweisen, auch nicht im Darmepithel und anderen besonders empfehlenswerthen Stellen, dann würde doch schon dieses negative Ergebniss der Mühe lohnen. Freie Nucleinsäure ist in der Zelle kaum zu vermuthen, weil sie sich, falls sie einmal abgespalten werden oder neu entstehen sollte, sofort mit den vorhandenen Eiweisskörpern zu Nucleinen vereinigen würde. Da die später zu schildernde Methode, einen sicheren Nachweis der Nucleinsäure gestattet, so wird obige Vermuthung sich leicht controliren lassen.

1. Nachweis der Albumose.

a) Granulaminimum der Albumosen in Gemischen.

Mit dem Albumosegehalt einer Lösung nimmt, wie p. 36 geschildert wurde, auch die Grösse der Granula ab, so dass z. B. Altmann's Gemisch aus schwach saurer 0,5-proc. Deuteroalbumoselösung nur noch kleine Granula (0,5—0,7 μ Durchmesser) ausfällt, die bei 0,1-proc. noch unter die Grösse der kleinsten Kokken herabsinken (unter 0,4 μ Durchmesser). Jetzt würde es mit Säurefuchsin-Pikrin wohl nicht mehr möglich sein, sie zwischen feingekörnten Gerinnselchen herauszudifferenziren, und selbst das empfindliche Eisenhämatoxylin würde nur noch unsichere schwankende Bilder geben. Die folgende Tabelle soll zeigen, wie weit der Albumosegehalt einer Mischung mit Serumalbumin herabsinken darf, ohne dass dadurch der Nachweis der Granula unmöglich wird. Unmöglich freilich nicht der allersubtilsten Untersuchung, sondern einer bequem und glatt auszuführenden. Als Färbung wird Altmann's Säurefuchsin-Pikrin benutzt, als Fällungsmittel 1-proc. Platinchlorid, die Lösungen Flemming's und Altmann's. In der Tabelle ist der Procentgehalt an Albumose und Serumalbumin und ferner der Erfolg der Granulafärbung eingetragen, letzterer in der Weise, dass + + + eine reiche Einlagerung mittelgrosser und leicht herausfärbbarer Granula andeutet, + + ebenso gute Färbung und Verbreitung, nur etwas kleinere Granula, +, dass diese zwar noch vorhanden, aber winzig sind und 0, dass ohne ganz besondere Sorgfalt nichts mehr von ihnen zu sehen war. Dabei ist noch zu ergänzen, dass Platinchlorid zwar etwas grössere Granula liefert als Flemming's Lösung, dass aber jene leichter sich entfärben als diese und auch als die mit Altmann's Osmiumbichromatgemisch erzeugten.

I. Deuteroalbumose.

No.	Deutero-albumose	Serum-albumin	Reaction	Platinchlorid 1-proc.	Flemming's Gemisch	Altmann's Gemisch
1	2	4	schwach alkal.	+ + +	+ + +	—
2	2	1	„ „	+ + +	+ + +	—
3	1	4	„ „	+ + +	+ +	—
4	1	1	„ „	+ + +	+ +	—
5	1	0,8	stark „	—	+ +	—
6	1	0,5	schwach „	+ + +	+ + +	—
7	0,5	0,25	„ „	0 (+)	0	—
8	0,25	0,2	stark „	0	0	—
9	2	0,8	stark sauer	+ + +	—	+ + +
10	1	0,8	„ „	+ + +	—	+ + +
11	0,5	0,8	„ „	0 (+)	—	+ +
12	0,25	0,8	„ „	0	—	0

II. Protalbumose.

No.	Prot-albumose	Serum-albumin	Reaction	Platinchlorid 1-proc.	Flemming's Gemisch	Altmann's Gemisch
1	2,5	1	schwach alkal.	—	+ + +	—
2	2	1	„ „	+	+	—
3	1	0,5	„ „	+	+	—
4	0,5	0,25	„ „	0	0	—
5	2	0,8	stark sauer	+ + +	+ + +	+ + +
6	1	0,8	„ „	+ + +	+ + +	+ + +
7	0,5	0,8	„ „	—	0	+
8	0,25	0,8	„ „	—	0	0

Für beide Albumosen ist die alkalische Reaction hinderlich, 0,5 Proc. ist dann bei beiden nicht mehr zur guten Granulabildung genügend, was nach Früherem nicht auffallen kann, und zwar versagt die Protalbumose, als der schwächere Granulabildner, schneller, schon bei 1 Proc. ist die Hemmung stark ausgeprägt. In saurer Lösung ist die Deuteroalbumose wieder etwas überlegen (0,5 Proc., Altmann's Gemisch). Für beide kann man nach der Tabelle 1 Proc. als diejenige Concentration bezeichnen, bei der sicher noch Granula reichlich und gut färbbar in die Gerinnsel eingelagert werden. Nimmt man 1 Proc. als das gesuchte Minimum an, so ist das wohl etwas zu hoch, denn auch 0,5 Proc. ist noch als nachweisbar, wenigstens in manchen Fällen anzuerkennen. Jedoch soll 1 Proc. als Granulaminimum gelten, damit nach abwärts noch gewisser Spielraum bleibt.

Nebenbei ersieht man noch aus der Tabelle, dass weder die absolute noch die relative Concentration des Gerinnselbildners auf die Granulabildung von Einfluss ist, wie ein Vergleich der No. 1—6 für Deuteroalbumose lehrt.

Hämoglobin muss, um mit Alkohol bei spurweise saurer Reaction schon Granula zu geben, ungefähr zu 1—1,5 Proc. in der Mischung enthalten sein, bei 0,5 ist eine Herausdifferenzirung der groben granulären Gerinnselchen und Kettchen nur noch mit Eisenhämatoxylin bequem. Man könnte also auch hier 1 Proc. als Minimum ansetzen.

b) Albumosegehalt thierischer Objecte.

Man wird sich vielleicht wundern, dass in den Gemischen nur Albumosen und nicht auch Pepton als Granulabildner verwendet wurden, dass im vorigen Kapitel nur für Albumosen das Minimum bestimmt wurde und dass auch in der neuen Ueberschrift nur von diesen und nicht vom Pepton die Rede ist. Das hat seinen Grund in der Umwälzung, die in den letzten 15 Jahren der Begriff des Peptones durchgemacht hat, denn das Pepton Kühne's und der neuen physiologischen Chemie entspricht nicht dem, was früher mit diesem Namen bezeichnet wurde. Das Pepton der älteren Forschung, der bei ihren Methoden das Pepton Kühne's oft vollkommen entschlüpfte, gehört durchweg zu den Albumosen im heutigen Sinne, vorwiegend zu den Deuteroalbumosen, theilweise zu den primären (Protalbumose). Echtes, durch Ammonsulfat nicht fällbares Pepton ist weder im Harn bei sogen. Peptonurie noch im Eiter oder sonstwo nachgewiesen worden (vgl. Neumeister, IV, p. 361, Stadelmann, I, p. 88—90), und auch bei der normalen Verdauung werden die Eiweisskörper wohl nicht bis zu Pepton verarbeitet, sondern schon auf seinen Vorstufen, als Syntonin oder Albumosen resorbirt (Neumeister, III, p. 245, 246). Das ist wenigstens die heutige Anschauung der physiologischen Chemie. Deshalb war es nicht nöthig, das reine Pepton speciell zu bearbeiten; nöthigenfalls genügen die p. 41 aufgezählten Reactionen zur Unterscheidung von Albumosen.

Quantitative Angaben über das Vorkommen von Albumose (Pepton im älteren Sinne) liegen für den Verdauungsprocess und für Eiter vor, zwei Fälle, die auch einer mikrochemischen Fixirungsanalyse leicht zugänglich sein werden. Aus einer Arbeit von Schmidt-Mülheim (I) ist zu ersehen, dass bei Verfütterung von 200 g Fleisch der Magen- und Darmsaft folgende Mengen Albumose enthielt:

Stunden nach der Fütterung	Magensaft	Darmsaft
1	0,75 Proc.	0 Proc.
2	0,5 „	0,15 „
4	0,5 „	fast 1,0 „
6	0,5 „	0,7 „
9	3,0 „	0,8 „
12	0,16 „	0,3 „

Fr. Hofmeister (I, p. 60) bestimmte in Procenten des Frischgewichtes der Organe den Albumosegehalt ebenfalls bei Hunden:

Stunden nach der Fütterung:	4	6	7	9	12	15	120
Magenwand	0,13	0,05	0,109	0,257	0,068	0,2	0,016
Wand des Dünndarmes	0,09	0,3	0,432	0,139	0,091	0,1	0,032
„ „ Dickdarmes	0,07	0,03	0	0,055	0,052	0,085	0

Für die Magenwand stellte Hofmeister (II, p. 9, 10) noch fest, dass die Albumose nur in der Mucosa, nicht in der Muscularis und Serosa vorkommt, also nur in jener Schicht, die zur Resorption der Verdauungsproducte bestimmt ist. Es enthielt 8 Stunden nach der Fütterung in zwei Fällen Albumose:

Mucosa des Magens	0,426 Proc.	0,0548
Muscularis „ „	0	0

Zu diesen Angaben Hofmeister's sei noch Folgendes bemerkt. Sie bestimmen nur den Albumosegehalt in Procenten des Frischge-

wichtes, das nicht ohne weiteres dem Zellinhaltsgewicht gleichzusetzen ist, da das Gewicht zahlreicher Gewebselemente, der Tunica propria und der Submucosa, sowie der Muscularis mucosae abzuziehen ist, die infolge ihrer Beschaffenheit die Albumose nicht enthalten können. Da ausserdem in der Lymphe nach Neumeister (V, p. 279) kein Pepton und keine Albumose sich nachweisen lässt, selbst bei reichlichem Vorkommen im Darm, so wird sich der Albumosegehalt für die Zellen der Mucosa wohl merklich steigern. Ebenso gilt das für die zuerst mitgetheilte Versuchsreihe Hofmeister's. Es ist nicht möglich, genau zahlenmässig die Correctur anzubringen, aber ca. 5 mal so hoch kann man wohl ohne Uebertreibung den Albumosegehalt für die Epithelzellen der Magen- und Darmschleimhaut ansetzen. Es würden sich dann folgende Minima und Maxima ergeben: Magenwand 1,3—0,08, Dünndarm 2,2—0,16, Dickdarm 0,43 bis unmessbar gering (0). Die Minima für Magen und Dünndarm treten erst 120 Stunden nach der Fütterung ein, deren Hauptwirkung nach 7—9 Stunden sich im Maximum bemerkbar macht. Für die Mucosazellen des Magens würde 8 Stunden nach der Fütterung der Albumosegehalt auf 2 und 0,3 anzusetzen sein. Wir bekämen so Zahlen, die für Granulaausfällung mehr als genügen, das Minimum sogar theilweise übersteigen.

In Eiter hat Hofmeister (III) einen als Pepton bezeichneten Körper aufgefunden, der aber nach den Reactionen (III, p. 269) sicher vorwiegend eine Albumose ist, was auch Stadelmann (I, p. 90) und Neumeister (IV, p. 361) bereits früher ausgesprochen haben. Nach Neumeister (IV, p. 361) ist zu erwarten, dass es sich um Deuteroalbumose handeln wird. Um so beachtenswerther sind folgende Angaben Hofmeister's:

Kalter Abscess in Folge von Periostitis	0,525, 0,538, 1,14 Proc. Albumose
„ „ „ „ „ „	0,367 Proc.
Parametritische Abscesse	0,874, 1,275 Proc.
Abscess bei Periphlebitis	0,601 Proc.

Minimum 0,37, Maximum 1,275 Proc.; der Durchschnitt 0,8 Proc. reicht an das Fällungsminimum heran. Hierzu ist noch zu ergänzen, dass Hofmeister (III, p. 274) besonders hervorhebt, dass die Albumose „vorwiegend an die geformten Elemente des Eiters gebunden ist". Eiter aus zwei Abscessen wurde filtrirt, das zellenfreie Filtrat enthielt 0,3 Proc., der zellenreiche Filtratrückstand 0,727 Proc. Albumose. Diese Zahlen würden sich auch noch etwas steigern, wenn man sie auf das wirkliche Zellvolumen reduciren könnte, aber nicht so stark wie bei der Magen- und Darmwand.

In leukämischem Blut fanden Freund und Obermayer (I) 1,2 Proc. eines als Pepton bezeichneten Körpers, der im normalen Blut nur zu 0,03 Proc. enthalten war und auch als Deuteroalbumose zu betrachten ist. Ferner hat Miura (I, p. 319) bei experimenteller Phosphorvergiftung in der Kaninchenleber gefunden: 0,76, 0,66, 0,42, 0,6, 0,14 Proc. Albumose des Frischgewichtes. Bei zwei an Puerperalfieber Gestorbenen, die an zahlreichen Krankheiten ausserdem litten, fand derselbe Forscher (I, p. 322) Albumose in der Leber 0,55 und 0,918 Proc., in der Milz 0,51 und 0,64 Proc., Herz 0,71, Niere 0,12 Proc., alles in Procenten des Frischgewichtes der Organe. Hieraus ist ja nicht zu ersehen, wo die Albumose gesessen hat, die Zahlen genügen aber, um zu zeigen, dass bei pathologischen Processen die

Albumosen sich reichlich ansammeln, sicher das Minimum der Granulafällung erreichen und überschreiten.

Selbst wenn die eine oder die andere der aufgeführten Zahlen zu hoch gegriffen wäre oder nur ein Theil davon auf wirkliche Albumosen entfiele, so bliebe doch immer noch eine so grosse Annäherung an das absichtlich sehr hoch genommene Granulaminimum übrig, dass die Möglichkeit, Albumosegranula durch Fixirungsmittel zu erzeugen und so die Albumose nachzuweisen, sicher zugestanden werden muss.

c) Schema für den fixirungsanalytischen Nachweis der Albumosen.

Da alkalische Reaction die Fällungskraft einiger Fixirungsmittel (p. 33) ganz unterdrückt und die anderer wenigstens herabsetzt, so hat das Schema hierauf besondere Rücksicht zu nehmen. Man müsste die Reaction des Zellinhalts, von Protoplasma und Kern selbst kennen. Das ist nun leider nicht möglich zu prüfen, ohne starke Eingriffe, die selbst schon eine Aenderung in der Reaction herbeiführen können. Auch an Pflanzenzellen ist die Entscheidung nicht leicht und unsicher. F. Schwarz (I, p. 12, 21) schematisirt, wenn er dem Protoplasma, dem Zellkern und allen seinen Theilen, Chromatin, Nucleolen, Gerüstsubstanz, durchweg alkalische Reaction zuschreibt. Denn seine Methoden, den Indicatorfarbstoff auf vorher durch Alkohol, heisses Wasser oder elektrische Schläge getödtete Zellen wirken zu lassen, ist doch nicht frei von uncontrolirbaren und heftigen Eingriffen. Wenn Schwarz (I, p. 12) die Bedeutung der alkalischen Reaction darin erblickt, dass sie allein die Proteinsubstanzen des Protoplasmas in Lösung erhalten könne, da schon geringe Mengen freier Säure genügen, sie auszufällen, so übersieht er, dass viele Eiweisskörper auch in Säuren löslich sind. Als Beispiele seien nur die Globuline genannt, die sowohl in schwach alkalischem, als auch in schwach saurem Wasser löslich sind und bei der Neutralisation wieder ausfallen. Auch Nucleinsäure wird nicht von jeder Säure gefällt und ist in schwach saurer Lösung beständig. Andere Eiweisskörper sind im Ueberschuss der sie zunächst fällenden Säuren wieder löslich. Kurz, man könnte aus demselben Grunde wie Schwarz gerade umgekehrt die saure Reaction als besonders vortheilhaft bezeichnen.

Viel zutreffender erscheint mir die Ansicht Berthold's (I, p. 68), dass man nicht ohne weiteres von der Reaction des gesammten Protoplasmas sprechen könne, jeder Theil könne anders reagiren, die Grundmasse vielleicht alkalisch, der Zellkern sauer und der Nucleolus vielleicht neutral oder wieder alkalisch. Man könnte wohl noch hinzufügen, dass wahrscheinlich die Reaction wechseln wird entsprechend den sich abspielenden Processen und dass für kein Organ der Zelle eine Reaction als typisch angesehen werden kann. Auch Pfeffer (I, p. 490) führt Beispiele dafür an, dass Protoplasma auch bei saurer Reaction fortbesteht und lebenskräftig arbeitet. Die saure Reaction thierischer Gewebsstücke en gros sagt zwar über die einzelne Zelle nichts Sicheres aus, sie ist aber doch von Einfluss auf den Fixirungsverlauf. Denn selbst wenn das Protoplasma alkalisch reagirte, und man hätte ein neutrales Fixirungsmittel angewendet, so würde dieses durch die Säure des Gewebssaftes angesäuert und könnte nunmehr die alkalische Reaction des Protoplasmas vielleicht ganz überwinden.

Seine Alkalescenz wird man nicht sehr hoch anzuschlagen haben, vielleicht der des Blutes entsprechend, ca. 0,2 Proc. Natronhydrat, wahrscheinlich aber niedriger. Eine ähnliche Reaction wie das Blut hat der Eiter, der nach Hoppe-Seyler (I, p. 490) frisch stets alkalisch reagirt. Wollte man also die Albumosen des Eiters granulär fällen, so würde man ihn mit Essigsäure vorher leicht anzusäuern haben, damit man neben den sauren Fixirungsmitteln auch die neutralen verwenden könnte.

Sauer reagirt nach verschiedenen Forschern die Magenschleimhaut. Näher hat Edinger (I, p. 253, 254) die verschiedenen Wandschichten eines verdauenden Kaninchenmagens mit Alizarinnatrium untersucht. Die Submucosa und die Serosa reagirte nicht sauer, die Muscularis unbestimmt und nur die Mucosa deutlich sauer. Sie verhielt sich aber nicht durchweg gleichartig und erschien nach der Behandlung mit dem Reagens scheckig, theils gelb (saure Stellen), theils roth (alkalisch oder neutral), was Edinger darauf zurückführt, dass immer nur ein Theil der Drüsen Säure ausscheidet, der andere nicht. Die Schleimhaut des Hundemagens war im Fundus- und Pylorustheil sauer. Im hungernden Magen konnte Edinger (I, p. 255) saure Reaction nicht feststellen; das Pancreas aber war trotz seines alkalischen Secretes sauer.

Liebermann (I, p. 36) wies an abpräparirter Mucosa des Schweinemagens mit Lakmuspapier schwach saure Reaction an der magenwärts gewendeten Epithelseite nach, während nach der Muscularis zu die Reaction meist neutral oder ganz schwach alkalisch, selten schwach sauer war. Fränkel (I, p. 68) fand bei den meisten Fröschen eine saure Magenschleimhaut. Sauer reagirt ferner das Nierengewebe (vgl. Liebermann, II, p. 55) und auch der frische ruhende Muskel, der stets Milchsäure, einen kleinen Theil in freiem Zustande, die Hauptmasse gebunden enthält; z. B. 0,125 Proc. des Frischgewichtes freie Milchsäure, 0,4 Proc. Gesammtmilchsäure bei der Katze, 0,197 Proc. freie, 0,346 insgesammt beim Frosch (Heffter, I, p. 263, 268). Diese oft untersuchte saure Reaction des Muskels ist noch für die Fixirungslehre deshalb bedeutungsvoll, weil sie beim längeren Liegen des herausgegeschnittenen Muskels zunimmt. Nach Landsberger (I, p. 356) konnten 3 g Froschmuskel 6 Minuten nach dem Herausschneiden aus dem Körper nur 0,06 ccm einer 1-proc. Natronlauge neutralisiren, eine Stunde später bereits 0,2 ccm. Die Nachsäuerung war in dieser kurzen Zeit schon recht ansehnlich, mehr als das Dreifache der ursprünglichen Säure. Auch die graue Substanz des Centralnervensystemes säuerte beim Absterben nach (Gscheidlen, I, p. 177), während die weisse Masse ihre neutrale oder schwach alkalische Reaction bewahrte. Einige weitere Angaben hierüber findet man bei Held (II, p. 210, 211) zusammengestellt. Dort wird auch gezeigt, dass trotz schwach saurer Reaction des Rückenmarkes in toto die einzelne Nervenzelle zunächst neutral oder schwach alkalisch ist und erst durch Eindringen saurer lymphatischer Flüssigkeit sauer wird.

Die ganze Erscheinung des Nachsäuerns herausgeschnittener Gewebsstücke (Muskeln, graue Nervenmasse) ist für den Fixirungsvorgang ausserordentlich wichtig. Neutrale Fixirungsmittel, die einer alkalischen Zelle zunächst gar nichts anhaben können, würden nach einigen Stunden in vollste Wirksamkeit treten. Man hat danach volles Recht, anzunehmen, dass Gewebsstücke mit ursprünglich alkalischer

Reaction nach mehrstündigem Liegen in der Fixirungsflüssigkeit derartig nachsäuern, dass nunmehr alle Fixirungsmittel etwa vorhandene Albumosen granulär ausfällen werden.

Um solche Albumosegranula sicher von anderen, ursprünglichen Granulationen der Zelle zu unterscheiden, bedarf es noch der kritischen Anwendung geeigneter Färbungsmethoden. Die Fixirungsmittel erhalten granuläre Bildungen des lebenden Protoplasmas sehr oft wohl unverändert in ihrer Form, verleihen ihnen aber neue Färbungseigenschaften, indem sie die Fähigkeit, Farbstoffe bei der Differenzirung festzuhalten, bald steigern, bald herabsetzen. Alle Osmium enthaltenden Fixirungsmittel steigern diese Eigenschaft, reiner Alkohol dagegen setzt sie durchschnittlich herab. Man wird daher neben Altmann's Säurefuchsin-Pikrinalkohol noch einige Färbungen mit Eisenhämatoxylin anzuwenden haben, weil hierbei erstens die Vorbehandlung mit Eisenalaun die Färbkraft steigert und zweitens die sanfte Differenzirung sehr feine Abstufungen der Entfärbung festzuhalten gestattet. Noch mehr empfiehlt es sich aber, z. B. Schnitte aus Alkoholmaterial vor der Färbung mit Osmiumsäure oder mit Albumoselösung zu imprägniren (vergl. später), weil hierdurch die Färbkraft ebenfalls gesteigert wird und es so gelingt, Granula sichtbar zu machen, die sonst selbst bei sehr vorsichtiger Differenzirung nicht hervortreten würden.

Statt Altmann's Fixirungsgemisch, das mit Albumose Granula gibt, die durch kein bequemes Lösungsmittel entfernt werden können, hat man 1 Proc. Osmiumsäure, die mit 1 Proc. Essigsäure versetzt ist, anzuwenden. Die so entstehenden Granula aus Osmiumalbumose kann man nach dem p. 40 beschriebenen Verfahren bequem herauslösen, ohne die Schnitte, die nur recht fest aufgeklebt sein müssen, zu schädigen.

Das Princip der fixirungsanalytischen Albumosereaction ergibt sich nunmehr von selbst: Anwendung einerseits von Fixirungsmitteln, die die Albumose entweder gar nicht oder wasserlöslich fällen, so dass in ausgewaschenen und gefärbten Schnitten nichts mehr zu sehen ist, anderseits von solchen Fixirungsmitteln, die unlösliche Granula geben. Es wird genügen, aus jeder Gruppe ein Mittel anzuwenden, dem nur in zweifelhaften Fällen ein zweites zur Controle anzuschliessen ist, das man aus folgender Uebersicht beliebig wählen kann.

Wenn wasserlösliche Albumosen in alkalischem Object vorkommen, müssen Granula sich finden bei Fixirung mit: Osmiumessigsäure, ferner Flemming's und Hermann's Gemisch, Platinchlorid, Chromsäure, auch bei Sublimat; bei etwaigem Nachsäuern der Gewebe auch bei Osmiumsäure, Kaliumbichromat, Altmann's Gemisch. In sauren Gewebsstücken geben alle die genannten Mittel Albumosegranula.

Wenn so nachzuweisende Granula wirklich aus Albumose bestehen, dann müssen sie ganz fehlen bei Fixirung mit Salpetersäure, Essigsäure, Alkohol, Aceton, Alkohol mit Salpeter- oder Essigsäure, Pikrinsäure, Pikrinschwefelsäure. Sind statt der Granula jetzt wasserunlösliche, gerinnselige Niederschläge vorhanden, so stammen diese sicher nicht von der Albumose, sondern von einem echten Gerinnselbildner her, der umgekehrt nicht die Granula mit Osmiumessigsäure etc. gegeben haben kann. Da niemals eine reine Albumoselösung vorausgesetzt werden darf, sondern stets ein Gemisch mit anderen Eiweisskörpern, so ist der Hauptwerth auf die granuläre Aus-

fällung zu legen, die Gerinnsel können die Bestimmung nicht stören. Täuschungen durch andere Granulabildner sind ausgeschlossen, denn Hämoglobin würde gerade mit Alkohol Granula geben, nicht mit Osmiumessigsäure, Nucleinsäure würde mit Osmiumsäure gar nicht ausfallen, etwaige, durch die Essigsäure hervorgerufene Ausfällungen der Nucleinsäure aber würden durch ihre vollkommene Acidophobie zu erkennen sein. Auch die Nachbehandlung mit Einbettungsalkohol kann keine Granula erzeugen.

Der fixirungsanalytische Nachweis der Albumose würde also in drei Theile zerfallen:

1) Fixirung mit Osmiumessigsäure und Alkohol, die erstere gibt Granula, wenn Albumose vorhanden, der letztere darf keine geben. Zur Controle wende man noch HERMANN'sche Lösung (Granula) und Pikrinsäure (keine Granula) an.

2) Färbung mit Säurefuchsin, Differenzirung mit Pikrinalkohol: im Osmiummaterial schön rothe Granula, im Alkoholmaterial nichts. Letzteres auch mit Eisenhämatoxylin gefärbt und ausserdem noch vor der Färbung mit Säurefuchsin, mit Albumose oder Osmiumsäure imprägnirt, um die Färbkraft zu steigern. Sind jetzt im Alkoholmaterial keine solchen Granula zu finden, wie bei Osmiumfixirung, so ist Albumose vorhanden.

3) Lösung der Osmiumalbumose mit Kaliumpermanganat und Salzsäure, Oxalsäure, heissem Wasser. Lösen sich die Granula nicht, so ist keine Albumose vorhanden, was sich auch schon bei der Fixirung dadurch zeigen wird, dass das Alkoholmaterial Granula enthält.

Da der Alkohol die Albumose auch ausfällt, aber wasserlöslich, so kann man noch eine weitere Prüfung vornehmen. Man bringe einen Schnitt aus dem Alkoholmaterial, ohne ihn mit Wasser zu berühren, also in Alkohol, unter das Mikroskop und stelle die Theile, wo Albumose nach dem Osmiummaterial zu vermuthen ist, ein. Findet man glänzende, knorrig-körnige oder homogene Massen, die beim Waschen mit Wasser zerfliessen und verschwinden, so würde das ein weiterer Beweis für die Albumose sein. Freilich verlangt diese Controle schon recht ansehnliche Albumosemengen, um ganz zweifellos wirken zu können.

Ferner sei noch darauf hingewiesen, dass auch die Grösse der Granula zur Unterscheidung von Fällungsgranulis und Zellgranulis herangezogen werden kann, aber auch nur mit Vorsicht. Aus Tabelle p. 36 ist bekannt, dass die verschiedenen Fixirungsmittel dieselbe Albumoselösung in verschieden grossem Korn fällen. Dasselbe müsste auch bei der im Gewebe enthaltenen Albumose sich zeigen, während Zellgranula durch verschiedene Fixirungsmittel annähernd immer in gleicher Grösse conservirt werden würden. Freilich nur annähernd, denn mittlere Schwankungen kommen auch vor. Nur wenn sehr grosse Differenzen in der Granulagrösse durch die verschiedenen Fixirungsmittel, die Albumose fällen, entstehen, ist auch dieser Umstand für den Albumosenachweis verwerthbar.

Einige die Granulalehre betreffende Anwendungen des geschilderten Verfahrens nebst Bemerkungen über das Pepton wird man im 3. Theil (Granulalehre) zusammengestellt finden.

2. Nachweis der Nucleinsäure.

Die Prüfung auf Nucleinsäure ist mit der auf Albumose leicht zu verbinden, denn der Alkohol fällt ja auch die Nucleinsäure wasserlöslich, ebenso die zur Controle heranzuziehende Pikrinsäure. In dem mit Osmiumsäure fixirten Material kann die Nucleinsäure, da nur 1-proc. Essigsäure empfohlen ist, ebenfalls nicht ausgefällt sein, weil diese zu schwach ist und Osmiumsäure überhaupt nicht wirkt. Um die Nucleinsäure zu fassen, könnte man Hermann's oder Flemming's Gemisch verwenden, einfacher vielleicht Platinchlorid (5 Proc.) oder Chromsäure (0,5—5 Proc.). Die Granula oder knorrigen, chromosomenähnlichen Bildungen aus Nucleinsäure, die von den 4 genannten Mitteln erzeugt werden, können selbst sehr klein bleiben und doch mit Sicherheit bestimmt werden durch die später genau zu besprechende Acidophobie. Darunter ist die Eigenschaft zu verstehen, dass alle sauren Anilinfarben in wässriger Lösung bei jeder Concentration, kalt oder heiss, vollkommen verschmäht werden. Finden sich also verdächtige Elemente, die basische Farben gut aufnehmen, so verwende man 2-proc. Säurefuchsin oder Lichtgrün oder 0,5-proc. Indulin. Es darf, wenn wirklich reine Nucleinsäure vorliegt, auch nicht der geringste Farbhauch sich zeigen. Imprägnirt man die Schnitte $^{1}/_{2}$ Stunde mit 5-proc. Albumose, spült in Wasser ab und färbt jetzt mit den genannten sauren Farben, so müssen diese von den früher ganz acidophoben Granulis lebhaft aufgenommen werden. Diese Methode genügt, nachdem die Acidophobie festgestellt ist. Man würde auch noch durch Eosin einen weiteren Beweis führen können; auch dieses wird, in Wasser gelöst, ganz verschmäht, färbt aber auch reine Nucleinsäuregranula äusserst intensiv, sobald es mit wenig Alaun versetzt ist, z. B. auf 8 ccm 0,5-proc. Eosinlösung 1 ccm 1-proc. Alaunlösung.

Mit Gemischen aus sauren und basischen Farben ist der Beweis für reine Nucleinsäure nicht möglich, was hier besonders, Späterem vorgreifend, erwähnt werden muss. Denn die basische Farbe wird schon, ausser bei vollkommener Acidophobie, auch dann aufgenommen, wenn die saure vielleicht nur wenige Secunden verschmäht wird. So färben sich die Chromosomen und alle ruhenden Kerne zwar auch in sauren Farben, besonders bei gewissen Fixirungen, nur widerstehen sie einige Secunden, die gerade genügen, um die basische Farbe eines Gemisches dominiren zu lassen. Hierüber vergleiche man den nächsten Theil.

Alle reinen Nucleinsäurefällungen aber sind ganz acidophob, und nur solche Theile im Kern und Protoplasma können aus reiner Nucleinsäure bestehen.

Als Schema für den fixirungsanalytischen Nachweis der freien Nucleinsäure empfiehlt sich Folgendes:

1) Fixirung mit Flemming's oder Hermann's Gemisch und mit Alkohol; in ersterem Granula oder knorrige, chromosomenähnliche Bildungen, die sich mit sauren Farben, kalt oder heiss, gar nicht färben. Im Alkoholmaterial werden diese Gebilde ganz fehlen.
2) Imprägnirung der Schnitte mit 5-proc. Albumose ($^{1}/_{2}$ Stunde kalt) und Färben mit denselben sauren Farben wie bei 1. Intensive Färbung der acidophoben Fällungen. Zur Controle Färbung der nicht imprägnirten Schnitte mit Alauneosin.

Aus dem Mitgetheilten wird man schon erkennen, dass die lebend so vergänglichen Chromosomen nicht aus reiner Nucleinsäure bestehen können, denn sonst könnten sie mit Alkohol nicht dauerhaft fixirt werden, ebensowenig mit Pikrinsäure. Ausserdem färbt sich das Chromatin auch sehr gut, besonders bei Sublimatfixirung, mit wässrigem Säurefuchsin oder Lichtgrün und kann auch desshalb nicht aus reiner Nucleinsäure aufgebaut sein. Tritt aber zu dieser noch ein Albumin, so ist das neu entstehende Nuclein nicht mehr vollkommen acidophob und färbt sich so wie die Kerne und Chromosomen mit sauren Farben, nur etwas langsamer als mit den basischen, weshalb diese im Gemisch mit sauren bevorzugt erscheinen. So könnte ein Nuclein schon wegen seiner Färbung aus einem solchen Gemisch als reine Nucleinsäure bestimmt werden, und deshalb sind die einfachen Lösungen saurer Farben allein entscheidend.

Um die Nucleinsäuregranula nach Flemming'scher Fixirung von etwaigen Albumosegranulis zu unterscheiden, sind ebenfalls die sauren Farben nöthig, sie genügen aber auch vollkommen. Ausserdem würde noch das mit Osmiumessigsäure fixirte und mit Säurefuchsin-Pikrin gefärbte Material die Unterscheidung vervollständigen.

Nach meinen bisherigen Erfahrungen und aus dem bereits p. 58 entwickelten Grunde zweifle ich, dass freie Nucleinsäure irgendwo in der Zelle sich so ansammelt, dass sie im fixirten Präparat erkennbar werden müsste.

Kapitel VI. Die Fixirung des Zellinhaltes.

Der Hauptzweck der Fixirung ist, wie allbekannt, eine möglichst naturgetreue Erhaltung der Structur des Protoplasmas und des Kernes. Damit diese unverändert den zahlreichen Manipulationen des Auswaschens, Entwässerns, der Paraffineinbettung und der Färbung widerstehen, müssen alle ihre Einzelbestandtheile unlöslich in allen denjenigen Lösungsmitteln sein, die hierbei angewendet werden. Ausser Wasser, Alkohol, Xylol und flüssigem Paraffin würden noch die Farblösungen selbst und etwa zum Differenziren benutzte verdünnte Säuren hierbei in Betracht kommen. Ueberführung in feste, unlösliche Verbindungen und Structuren ist also das Grundprincip der Fixirung. Gierke (II, p. 213) hat bereits darauf hingewiesen, dass diese Veränderung des Aggregatzustandes die unentbehrliche Grundlage für die histologische Färbung ist, weil „zähflüssige Substanzen sich überhaupt nicht dauernd zu tingiren scheinen". Weitere Beiträge zu dieser Ansicht wird man im nächsten Theile finden.

Da die feineren Structuren des Protoplasmas und Kernes doch sicherlich aus Eiweisskörpern im weitesten Sinne bestehen, so engt sich die Aufgabe der Fixirung dahin ein, diese Stoffe unter Bewahrung ihrer morphologischen Ausgestaltung unlöslich zu machen. Die in den vorigen Abschnitten genauer besprochenen Fixirungsmittel sind dazu nicht gleichmässig befähigt, weil einige von ihnen gewisse Eiweisskörper zwar fällen, aber nicht unlöslich. Andere und gerade die gebräuchlichsten Fixirungsmittel fällen alle Eiweisskörper so aus, dass sie weder in Wasser, noch schwachen Säuren und Basen, noch den Farblösungen sich lösen.

Diese Nothwendigkeit der Fixirung gestattet uns, Rückschlüsse auf den Aggregatzustand der den lebenden Zellleib aufbauenden Eiweisskörper zu ziehen. Denn wenn diese bereits unlösliche und desshalb dauerhafte Structuren in der lebenden Zelle bildeten, dann würde die Fixirung entbehrlich sein. Auch durch den natürlichen Tod eines Organismus wird das Protoplasma seiner einzelnen Zellen nicht so erstarrt, dass es unveränderlich nunmehr seine Structur beibehielte. Kerntheilungen, die vor dem Tode noch eingeleitet worden waren, verändern sich postmortal und verschwinden schon nach 1—2 Tagen. Aus einer Arbeit SCHENK's (I) über die Erhaltung der Mitosen im Knochenmark todter Kaninchen, ist zu ersehen, dass schon $^1/_2$ Stunde nach dem Tode die meisten Mitosen undeutlich geworden sind. SCHENK hatte mit FLEMMING'scher Lösung, 0,2-proc. Chromsäure und Alkohol fixirt und fand sogleich nach dem Tode in 19 Gesichtsfeldern 80 gut conservirte Kernteilungsfiguren, $^1/_2$ Stunde später nur noch 9 deutliche und 31 undeutliche. 5 Stunden nach dem Tode enthielten 18 Gesichtsfelder 13 undeutliche und keine einzige deutliche Theilungsfigur.

Etwas langsamer vergingen nach HAMMER (I, p. 35, 39) in einer menschlichen Leiche die Mitosen, nach mindestens 48 Stunden waren sie auch hier „ganz unkenntlich" geworden. Viel zeitiger schon fand aber auch HAMMER starke Umgestaltungen der Chromosomen, die ihre typische Form allmählich verloren. Postmortale Veränderung der ruhenden Kerne und des Cytoplasmas sind ja hinreichend bekannt. Alles das zeigt, dass die vitalen Structuren recht hinfällig sein müssen, dass sie zum Theil schon in der Zellflüssigkeit sich langsam lösen, sobald der Tod das unbekannte Etwas des Lebens gelöscht hat.

Unbeeinflusst zunächst von einer bestimmten Vorstellung und Theorie über die Structur des Protoplasmas, wollen wir uns nunmehr überlegen, in welchem Aggregatzustande die Eiweisskörper darin überhaupt vorkommen können. Neben das eine Extrem, vollkommen gelöst, stellt sich scheinbar auch das andere des vollkommen festen Zustandes. Aber nur scheinbar, weil alle Eiweisskörper quellungsfähige Colloide sind, die also immer von dem Wasser des Protoplasmas etwas aufnehmen müssen. Nur zahlreiche Stadien der Quellung, als Vorstufen der Lösung, wird man zu erwarten haben, die am schwächsten gequollenen Theile werden noch den Eindruck eines festen Gefüges machen, die am stärksten gequollenen werden zähflüssig erscheinen. Die am wenigsten gequollenen Gebilde wollen wir der Kürze halber als „festere" bezeichnen. Vollkommen gelöste Eiweisskörper können diffus vertheilt oder in Vacuolen eingeschlossen sein, die bei starker Concentration schon im lebenden Protoplasma das Aussehen fester Körperchen haben können. Alle gelösten Eiweisskörper müssen in der ihnen eigenen Fällungsform bei der Fixirung gefällt werden, löslich oder unlöslich, je nach dem Fixirungsmittel. Die specifische Fällungsform wird unfehlbar hervortreten, wenn die Stoffe diffus gelöst oder in grosse Vacuolen eingesperrt waren. Sinkt aber deren Durchmesser und steigt die Concentration, so wird es immer wahrscheinlicher, dass ihr Inhalt in toto gefällt wird, unter Beibehaltung der Vacuolenform. Im gefärbten Präparat würden statt der Vacuolen mit dem ursprünglich flüssigen Inhalt homogene Granula liegen.

Durch andauernde Concentration der Vacuolenlösung kann der Eiweisskörper in festerer Form, als kugeliges Gebilde, sich ausscheiden,

wie z. B. die Proteinkörner der Pflanzensamen. Ist der auf diese Weise condensirte Eiweisskörper in der Zellflüssigkeit löslich, so wird er nur durch die protoplasmatische Vacuolenwand geschützt. Auch dieser Schutz geht verloren, sobald das Protoplasma abstirbt, und desshalb bedürfen auch diese verfestigten Vacuoleninhalte der Fixirung, damit sie ihre Löslichkeit in Wasser, schwachen Säuren und Basen verlieren. Dasselbe gilt für alle anderen, in festerem Zustande, am Aufbau des Protoplasmas theilnehmenden Eiweisskörper, gleichviel ob sie als Fäden, als Gerüstwerk, als Fasern und Strahlen ausgestaltet sind, denn sie alle sind doch schliesslich als Eiweisskörper nicht vollkommen unlöslich. Erst recht bedürfen die stärkeren Quellungszustände, die zähflüssig erscheinenden Bestandtheile, der Fixirung, damit sie fest und unlöslich werden. Solche gequollene Eiweisskörper werden um so mehr zur Ausscheidung in ihrer specifischen Fällungsform neigen, je dünnflüssiger sie sind; sie werden um so leichter sich in toto und homogen fixiren lassen, je zäher und wasserärmer sie sind.

Die Fixirungsmittel haben demnach eine äusserst mannigfaltige Gelegenheit, durch Fällung das ursprüngliche Structurbild zu verändern, viel mehr, als das gegenwärtig zugestanden wird. Günstig sind die Aussichten auf eine naturgetreue Erhaltung nur für die lebend bereits festeren Gebilde. Das Hauptaugenmerk lenkt sich auf die Chromosomen, die im fixirten Präparat durchaus als solide Körperchen, vergleichbar den sphärokrystallinischen Fällungsgranulis, erscheinen. Lebend sind ja die Chromosomen zweifellos bereits gesehen worden (man vergleiche Peremeschko, I, p. 451, Schleicher, I, p. 263—268, Flemming, VII, p. 374—385, Strasburger, I, p. 114), aber doch viel weniger scharf als in fixirtem Zustande. Ich habe in den Staubfadenhaaren von Tradescantia ebenfalls die Chromosomen wohl unterscheiden können, aber auch nicht scharf. Wenn sie in der lebenden Zelle schon die festen Körperchen wären, als die sie nach der Fixirung erscheinen, so müssten sie doch schärfer hervortreten und sie dürften auch nicht so vergänglich sein. Mehr als ihr bereits erwähntes postmortales Verschwinden spricht dafür ihre leicht zu beobachtende Rückbildung, wenn die Theilung gestört wird. Das geschieht leicht an den Tradescantiahaaren. Man wird oft sehen, dass Chromosomen, die so gut wie möglich sich erkennen lassen, in kurzer Zeit wieder abblassen und dass der Kern auf den gröberen punktirten Zustand wieder zurückkehrt. Diese grosse Empfindlichkeit beruht zu einem Theil sicher darauf, dass die Chromosomen zähflüssig und nicht feste Gebilde mit unverrückbarer Structur sind[1]). Desshalb ist auch zuverlässig anzunehmen, dass die Fixirungsmittel auch die Chromosomen verändern müssen, einerseits durch Verdichtung und Gerinnung im Allgemeinen und oft zweitens auch durch die specifische Fällungsform, in der die Eiweisskörper oder Nucleinstoffe der Chromosomen ausgeschieden werden. Hier ist an die so oft und vielfach beschriebene granuläre Structur des Knäuels und der isolirten Chromosomen zu denken.

Selbst wenn sie aber festere Körperchen wären, so entgingen sie doch nicht dem Fixirungsmittel, das sie doch erst unlöslich machen

[1]) Meves (I, p. 41) nimmt an, dass sie aus einer „sehr nachgibigen Masse bestehen, weil sie sonst, wenn an einem Punkt ein Zug ansetzt, nicht sofort ihre Gestalt ändern würden". Pfeffer (I, p, 38) vermuthet, dass die Chromosomen etwa einen gelatinösen Aggregatszustand besitzen.

muss, wie alle anderen festeren Theile auch. Das geschieht bei physikalischer Fällung einfach durch gänzliche Wasserentziehung, wie beim Alkohol; meistens aber ist die Fällung eine chemische.

Man verwandelt also alle Eiweisskörper der Zelle in die entsprechende chemische Verbindung des Fixirungsmittels. Der Entstehung von Structur vortäuschenden Artefacten ist dabei Thür und Thor geöffnet; jedes Fixirungsmittel wird ein besonderes Fixirungsbild hinterlassen. Hierfür weitere Belege aus der Literatur zu häufen, ist wohl unnöthig. Wichtiger ist es, einige Fingerzeige dafür zu geben, wie man vielleicht solche Artefacte erkennen und das Fixirungsbild auf die vitale Structur reduciren könnte, wenn der unmittelbare Vergleich damit ausgeschlossen ist. Nothwendig wird es stets sein, eine grössere Zahl von Fixirungsmitteln auf dasselbe Object wirken zu lassen, freilich nicht beliebig herausgegriffene, sondern sorgfältig nach ihren in den vorigen Kapiteln festgestellten Eigenschaften auszuwählende. Wenn bestimmte Structurbilder nur durch eine der oben unterschiedenen Gruppen von Fixirungsmitteln sich festhalten lassen, so ist wohl sicher ein Artefact anzunehmen. Ebenso würden die p. 62 und p. 65 geschilderten Verfahren dazu geeignet sein, Fällungen von Albumose und Nucleinsäure zu bestimmen. Bewährt sich eine Structur dauerhaft und gleichmässig in zahlreichen Fixirungsmitteln aller Gruppen, so gewinnt es an Gewissheit, dass sie wirklich möglichst naturgetreu erhalten ist. Ein unverzerrtes Abbild der ursprünglichen Structur wird aber kein einziges Mal zu erreichen sein, weil die Fixirung doch gerade die Fällung aller noch nicht unlöslichen Bestandtheile anstrebt. Nur der Grad der hierdurch eingeleiteten Veränderung wird verschieden gross sein. Was man oft als eine Verdeutlichung einer vital unsichtbaren Structur deutet, ist in Wirklichkeit oft nur ein Fällungsbild, das natürlich an demselben Object mit der Regelmässigkeit wiederkehren muss, mit der auch die vitalen Vorgänge im Zellleben sich wiederholen. Gewisse Stadien der Mitose müssen bei gleicher Fixirung daher auch immer ein annähernd gleiches Bild geben, ohne dass man hieraus auf die Naturtreue zurückschliessen dürfte. Unter gleicher Fixirung wolle man hier verstehen, dass dasselbe oder ein ähnlich wirkendes Fixirungsmittel derselben Gruppe angewendet wird. Greift man zu einer anderen Gruppe, so wird man mit derselben Regelmässigkeit, wie vorhin, ein etwas anderes Bild bekommen, das man mit gleichem Recht wie das vorige als naturgetreu ansprechen könnte. Je feiner die mikroskopische Analyse sich bis in die zartesten Einzelheiten ergeht, um so grösser ist die Gefahr, Kunst und Natur zu verwechseln. Um so mehr, weil ja die Fällungsformen der Eiweisskörper kein den vital schon sichtbaren Plasmastructuren gegenüber fremdartiges Aussehen haben. Granula und feinpunktirte, gerüstige, netzige oder dicht zusammengeschobene Gerinnsel haben doch durchaus ein „natürliches“ Gepräge. Dazu werden noch im 3. Theil die künstlichen Strahlungen und die Schaumstructuren kommen.

Herrscht statt der Regelmässigkeit aber die Unregelmässigkeit, so ist man nicht berechtigt, eine bestimmte Auswahl unter den Bildern zu treffen und diese als gut fixirt und naturgetreu vor den anderen zu bevorzugen. Denn wenn eine Lösung in einer Zelle naturgetreu conservirt hat, so muss sie es auch in der Nachbarin gethan haben. Das abweichende Bild verräth nur, dass hier das Fixirungsmittel

andere Bedingungen vorfand als dort. Es empfiehlt sich daher, den „schlecht fixirten“ Stellen eines Schnittes dasselbe Vertrauen entgegenzubringen wie den guten und sie nicht einfach, wie jetzt oft geschieht, zu ignoriren. Die neuere Zellforschung, besonders die Mitosenlehre, ist, genau betrachtet, nichts anderes, als die Untersuchung ausgewählter Fällungsbilder nach Fixirung mit FLEMMING'scher oder HERMANN'scher Lösung, ergänzt durch einige andere Mittel, deren Erfolge aber auch nach den Bildern der genannten Gemische zurechtgestutzt werden. Unter dieser Einschränkung hat allerdings die Zellforschung viel geleistet, aber dem natürlichen Verlaufe der Dinge ist sie damit nicht näher gekommen als in einer älteren Periode, wo man die Alkoholbilder studirte. Es ist nur ein neues Fixirungsbild an die Stelle des veralteten getreten. Sachgemäss hätte die Beschreibung der Kerntheilungsvorgänge immer zuerst zu betonen, dass das Abbild beschrieben werden soll, das die betreffende Fixirung von der Natur uns hinterlässt. Ein Durcheinanderwerfen der mit verschiedenen Fixirungen erzielten Abbilder wird uns der Natur nicht näher bringen, sondern uns noch mehr davon entfernen.

Der natürlichen Structur des Protoplasmas steht der mit Fixirungsmitteln arbeitende Forscher nicht anders gegenüber, wie BÜTSCHLI, als er (IV, p. 22) durch eine „Art Gerinnung“ die Elementarstructur erstarrter Gelatine durch Chromsäure verdeutlichen wollte. In dem Abschnitt über die Wabentheorie wird man sich davon genau überzeugen können, dass die feine Schaumstructur der Chromgelatine nicht einmal eine primäre Fällungsstructur ist, sondern erst secundär sich entwickelt, und dass auf dem von BÜTSCHLI eingeschlagenen Wege eine Elementarstructur erstarrter Gelatine überhaupt nicht zu ermitteln ist. Noch näher an die Fixirung des Zellinhaltes reichen die Versuche heran, die ebenfalls im 3. Theile dieses Buches (Polymorphie der Eiweisskörper-Schaumstructur) beschrieben werden sollen. Durch Alkohol ganz homogen, in klebrig-zähem Zustande, der mit dem vieler Plasmagebilde sicher zu vergleichen ist, gefällte Albumose lässt sich durch die beliebtesten Fixirungsmittel nicht in ursprünglicher Beschaffenheit conserviren, sondern wird in das schönste secundäre Schaumgebilde verwandelt (Fig. 17).

Sind aber die Niederschläge der Eiweisskörper von Anfang an fester und beständiger, wie z. B. die Neutralisationsfällungen des Globulines, Albumines und Caseines (vergl. 3. Theil, Polymorphie der Eiweisskörper), so verändern die Fixirungsmittel das ursprüngliche Bild nicht mehr. Die schönsten Strahlungen oder grobe Vacuolisirungen in feingerüstigem Gerinnsel erhalten sich ohne die leiseste Verschiebung. Freilich nur dann, wenn die sie umgebende Flüssigkeit fällbare Stoffe nicht mehr gelöst enthält (Fig. 13*b*, u. 18). Wenn wirklich die in der lebenden Zelle sichtbaren Structuren bereits die Beständigkeit jener eben erwähnten Niederschläge hätten und die Zellflüssigkeit (Zellsaft, Enchylema, Kernsaft etc. zusammengenommen) ganz frei von fällbaren Stoffen wäre, dann müssten die Fixirungsmittel ganz naturgetreu conserviren: die Deutlichkeit des Gefüges könnte sich wohl steigern, aber es dürften keine neuen Structuren hinzukommen. Man entschuldigt dieses letztere wohl damit, dass auch diese Structuren intra vitam schon bestanden haben, aber nur zu zart waren, um sich von der sie umgebenden Zellflüssigkeit abzuheben. Wäre dies richtig, dann dürften aber viele der erst nach der Fixirung

sichtbar werdenden Gebilde nicht so grob und so dicht sein, wie sie wirklich sind. Denn wären sie schon vor der Fixirung so beschaffen gewesen, dann hätte man sie auch schon sehen müssen. Ich brauche wohl nur auf die Beispiele aus der Literatur zu verweisen, die bei den einzelnen Fixirungsmitteln erwähnt wurden und untrüglich zeigen, dass wirklich secundäre Fällungen sich einstellten. Diese müssen ja auch unfehlbar entstehen, wenn gelöste Eiweisskörper in der Zelle vorkommen. Wer annimmt, dass das fixirte Bild ganz naturgetreu ist, der muss beweisen, dass erstens die Zelle keine Eiweisskörper in Lösung enthält, dass zweitens die geformten Theile des Inhaltes bereits festere Gebilde sind, vergleichbar den Neutralisationsniederschlägen der Albumine und Globuline etc. Wäre das wirklich der Fall, dann könnten aber die vitalen Plasmastructuren nicht so vergänglich und leicht zerstörbar sein, abgesehen davon, dass der Aggregatszustand des Protoplasmas darauf schliessen lässt, dass der gallertige, zähflüssige Zustand vorherrschen muss. Die Einwirkung der verschiedenen Fixirungsmittel auf das Färbungsvermögen der Objecte behandelt im nächsten Theile der Abschnitt über primäre und secundäre Chromatophilie.

II. THEIL.

Die Färbung.

Mit der Nennung GIERKE's hat dieser Theil zu beginnen, damit sogleich daran erinnert wird, dass die allgemeinen Anschauungen, die GIERKE in seiner Begründung der physikalischen Färbungstheorie (II, p. 187—221) entwickelt hat, auch meinen Untersuchungen zur Richtschnur gedient haben. Dass ein so langer Weg gewählt werden musste, um diese Theorie der Vergessenheit zu entreissen und neu zu begründen, erklärt sich ungezwungen aus der Sprödigkeit und und Schwierigkeit des Problemes. Weil GIERKE seine theoretischen Erklärungen nur mit wenigen Experimenten begründen konnte, desshalb hat man sich bald ganz davon abgewendet und der viel mehr verheissenden chemischen Theorie anstandslos in die Arme geworfen.

Eine Neubearbeitung von GIERKE's Theorie hat auch RAWITZ, der sich als Anhänger GIERKE's bekennt, nicht versucht, denn er meint (III, p. 74), dass er „nichts hinzuzufügen wüsste". Andererseits vermuthet P. MAYER (I), dass GIERKE, wenn er noch lebte, seine eigene Darstellung wohl nicht mehr für zutreffend halten möchte. Um so mehr ist es Pflicht, die Verdienste GIERKE's hier in die Erinnerung zurückzurufen und zu erneuter Geltung zu bringen.

Meine Aufgabe war weniger die, die allgemeinen physikalischen Grundlagen der Theorie von neuem zu wiederholen, sondern vielmehr die, neue Beweise dafür aufzusuchen und die Einwände, die von den Verfechtern der chemischen Theorie erhoben worden sind, durch Versuch und Kritik zu widerlegen. Viele dieser Angriffe gegen die mechanische Erklärung sind erst in den letzten 13 Jahren, nach dem Erscheinen von GIERKE's Abhandlung, unternommen worden und haben, da GIERKE sie nicht mehr selbst abwehren konnte, die neuere Zellforschung beherrscht, ohne auch nur auf schwachen Widerstand zu stossen, eine scheinbare Stütze in den Anschauungen der Färbungstechniker findend. Das Programm für die Untersuchung war somit gegeben, nachdem die künstliche Fällung der Eiweisskörper mit Fixirungsmitteln ein gut färbbares Object geliefert hatte, das mit den p. 80 aufgezählten Vorzügen ausgestattet war. Ihnen ist es zu danken, dass die physikalische Theorie der Färbung, besser und vielseitiger begründet, sich wieder an das Licht wagen darf. Um den Fortschritt gegenüber der ersten Fassung GIERKE's kurz zu kennzeichnen, wird es genügen, die wichtigsten Thatsachen und Probleme, die mechanisch

erklärt werden konnten, hier zu nennen. An die Spitze ist das im Kapitel III und IX besprochene primäre Adsorptionsvermögen zu stellen, das die Election aus heterogenen Farbgemischen beherrscht. Die Basophilie der Kerne und ihr verwandte Chromatophilien, die besonders den Anschein chemischer Vorgänge erwecken, sind als Wirkungen mechanischer Affinitätskräfte verständlich geworden, nachdem die ungleiche Färbkraft saurer und basischer Farben als eine Folge der physikalischen Eigenschaften ihrer wässrigen Lösungen sich erwiesen hatte (Kap. IX). Die Aufbesserung der sauren Farben nach den Recepten der technischen Färberei (Kap. III, 2), beruht darauf, dass sie auf den gleichen Grad der relativen Löslichkeit herabgedrückt werden, den die basischen Farben haben (Kap. IX). Die Ueberwindung des einseitigen Adsorptionsvermögens, das die Nucleinsäure primär auszeichnet und secundär auch bis zu gewissem Grade durch Fixirungsmittel (Platinmetalle) an sich indifferenten Eiweisskörpern ertheilt werden kann, bedarf keineswegs einer chemischen Wechselwirkung zwischen Farblösung und Färbungsobject (Kap. III, 2). Im Anschluss an das primäre Adsorptionsvermögen und die daraus entspringende Chromatophilie wurde der Begriff des Chromatins und der Kernfarbstoffe (Kap. VIII) auf das Maass eingeschränkt, zu dem die physikalische Grundlage des Färbungsprocesses allein berechtigt.

Der complicirten Wirkung der heterogenen Farbgemische (Kap. V, 5) und der Hämatoxylinlösungen (Kap. V, 6) ist die viel einfachere der homogenen Farbgemische gegenüberzustellen, die bei gleichem oder ähnlichem Adsorptionsvermögen aller einzelnen Theile des Objectes stets entsprechend der relativen Diffusionsgeschwindigkeit (Kap. V, 1) und Concentration (Kap. V, 2) ihrer Componenten doppelt färben und die einzelnen Gebilde des Objectes nach Grösse und Substanzreichthum sortiren. Gemische saurer Farben geben vorwiegend Diffusionsfärbungen (Kap. V, 3), Gemische basischer aber vorwiegend Concentrationsfärbungen (Kap. V, 4). Zu diesen letzteren gehören auch alle durch unreine Farbstoffe erzeugten Metachromasien (Kap. V, 4, *3*), denen die chemische Theorie der Färbung früher besondere Beweiskraft zuerkannte. Fernerhin wurde die Chromatophilie der Sexualkerne (Kap. V, 4, *4*) als eine Folge der biologischen Aufgabe der männlichen Geschlechtszellen ebenfalls der physikalischen Erklärung unterworfen. Am leichtesten war es, die succedanen Doppelfärbungen (Kap. IV) mechanisch bis in alle Einzelheiten zu verfolgen und die Inversion solcher Chromatophilien herbeizuführen (Kap. IV, 2).

Weitere neue Beweise für die hier vertretene Auffassung brachte die Färbung nicht ausgewaschener Niederschläge (Kap. II, 1), aus der sich die theoretische Bedeutung des Auswaschens (Kap. II, 3) fast von selbst ergab. Unterstützt und wesentlich erweitert wurden diese Schlussfolgerungen durch die Umstimmung und Vernichtung des Färbungsvermögens durch Imprägnation (Kap. VI). Auf diese Versuche, besonders die mit der Nucleinsäure (Kap. VI, 5), möchte ich den Leser hier noch besonders aufmerksam machen, weil sie unter den Grundpfeilern der mechanischen Theorie wohl die stärksten sind. Der Verfechter der

chemischen Anschauung wird endlich ausser den Ansichten der Färbungstechniker (Kap. VII, 1) auch die übrigen geläufigsten Einwände seiner Richtung, wie Auswaschbarkeit, Intensität und Nuance der Färbung (Kap. VII, 2), die Lebendfärbung und Nothwendigkeit der Fixirung (Kap. VII, 3) und die Reactionsfähigkeit der gespeicherten Farben (Kap. VII, 4) kritisch behandelt finden und erkennen, dass auch hier die mechanische Theorie der Färbung nicht nur zur Erklärung ausreicht, sondern sie allein oft ermöglicht.

Kapitel I. Die Objecte der Färbung und ihr Werth für die Färbungstheorie.

1. Die natürlichen Objecte.

Aus zahlreichen Gründen sind die natürlichen Objecte wenig geeignet zu färbungstheoretischen Untersuchungen. Zunächst ist trotz vieler Anläufe einer mikro- und makrochemischen Analyse des Protoplasmas und Kernes doch nur wenig über ihren Aufbau aus chemischen Individuen bekannt. Diese Untersuchungen würden ausserdem nur so weit brauchbar sein, als sie nicht selbst auf Tinctionen beruhen. Wenn z. B. Lilienfeld (I, p. 394) es für „höchst wahrscheinlich" erklärt, dass die Chromatinschleifen während der Mitose aus freier oder sehr eiweissarmer Nucleinsäure bestehen, so stützt er sich doch nur auf einen Vergleich der Färbung chemisch reiner Nucleinsäure und derjenigen der Chromosomen mit einem Farbgemisch. Denn die rein chemische Mikroanalyse der Mitose ist auch heute noch nicht so weit gediehen, Lilienfeld's Vermuthung zu bestätigen. Wenn wir auch, dank den zahlreichen Arbeiten Miescher's und Kossel's sicher wissen, dass Nucleinkörper im Zellkern, besonders im sog. Chromatin vorkommen, so ist doch kaum anzunehmen, dass letzteres aus reiner oder fast reiner Nucleinsäure besteht. Vielmehr sprechen Kossel's (II) Resultate und auch gewisse Angaben Lilienfeld's selbst (III, p. 478—482) dafür, dass complicirte Proteide, Verbindungen von Nucleinsäure mit Albumin die chromatische Substanz aufbauen. Wie trügerisch die natürlichen Objecte sich auch gegenüber rein chemischen Reactionen verhalten, zeigt auch die Phosphorreaction nach Lilienfeld und Monti (IV), die nach Heine (I, p. 499; II, p. 134) und Raciborski (I) ebenso an phosphorfreien Materialien eintritt und mit den Farbeinlagerungen auf eine Stufe zu stellen ist.

Auch die verschiedenen chromatophilen Granulationen, die Ehrlich (II) mit seinen bekannten Farbgemischen in den Leucocyten unterscheidet, entbehren einer sicheren Grundlage, weil ihre chemische Natur ganz unbekannt ist, und können daher für die chemische Theorie der Färbung nicht ins Feld geführt werden. Ihre Unterscheidung wird noch hinfälliger, als sie schon ist, durch die später zu besprechende Thatsache, dass Albumosegranula aus derselben Fällung, z. B. mit Kaliumbichromat, in Ehrlich's eosinophilem und triacidem Gemisch theils eosinophil, theils nigrophil oder theils acido-, theils neutrophil sich färben und dass nur die Grösse des Kornes, also seine physikalischen Eigenschaften, darüber entscheiden.

Noch unbrauchbarer werden die natürlichen Objecte für färbungstheoretische Grundversuche durch die Vorbehandlung mit Fixirungsmitteln, die an den unbekannten chemischen Körpern des Zellinhaltes uncontrolirbare Veränderungen hervorrufen, theils chemische, theils physikalische. So kann die Fähigkeit des Kernes, Farbstoffe bei der Differenzirung festzuhalten, merklich verschoben werden. Mit ALTMANN's Chromosmiumgemisch und mit HERMANN's Lösung oder 1-proc. Platinchlorid fixirtes Dünndarmepithel des Hundes mag als Beispiel hierfür dienen. Bei der ersten Fixirung sind die Kerne in Präparaten, die die ALTMANN'schen Granula prachtvoll gefärbt zeigen, bereits vollkommen durch den Pikrinalkohol entfärbt, was auch alle Abbildungen ALTMANN's (I) bestätigen können. Bei HERMANN'scher Fixirung oder in den Platinchloridpräparaten, die beide auch schöne Zellgranula liefern, sind die Kerne noch stark gefärbt, ja sie bleiben länger gefärbt als die leichter sich entfärbenden Granula. Man würde vollkommen im Finsteren tappen, wenn man mit solchem Material eine Theorie der Färbung bearbeiten wollte. Sie hat sich auf Objecten aufzubauen, deren chemische Natur man möglichst genau kennt. Erst wenn dies geschehen, können die natürlichen Objecte zur breiteren Beweisführung herangezogen werden.

2. Eiweisskörper in Substanz und in Lösung.

Um die Mängel der histologischen Präparate zu vermeiden, hat man chemische Präparate der Eiweisskörper theils fest, theils in Lösung mit Farblösungen behandelt und hoffte hierdurch der chemischen Theorie die Wege zu ebnen. Das Jahr 1893 brachte zwei solche Versuche, den einen von LILIENFELD (I, p. 392—396), den anderen von E. ZACHARIAS (I, p. 188). Der erstere benutzte eine Mischung von Fuchsin und Methylgrün von braunvioletter Farbe und schüttete Nucleinsäure oder Eiweiss hinein, erstere färbte sich intensiv grün, letzteres purpurroth, so dass (I, p. 393) „die Bodensätze von der darüber stehenden Flüssigkeit in ihren Tönen im höchsten Grade abstachen". Aus einem Gemisch von Safranin-Lichtgrün fand LILIENFELD den basischen Farbstoff (Safranin) in der Nucleinsäure gespeichert, während das Eiweiss grün, „acidophil" sich gefärbt hatte. „Dass es sich hier um Processe chemischer und nicht physikalischer Art handelt", wird nach LILIENFELD (I, p. 395) von nun an „wohl keiner mehr bezweifeln". Andere Resultate erhielt aber LILIENFELD selbst (II, p. 554) bei Färbungsversuchen mit Mucin, das aus EHRLICH's Triacidmischung das basische Methylgrün, aus Safranin-Lichtgrün aber das saure Lichtgrün aufnahm: „aus dieser regellosen Farbstoffwahl möchte ich (LILIENFELD, II, p. 554) schliessen, dass bei der Mucinfärbung chemische Erscheinungen nicht vorliegen." So bietet uns LILIENFELD selbst den schönsten Beweis für die Werthlosigkeit solcher Versuche, denn das eine Mal folgt mit zweifelloser Sicherheit, dass chemische Processe vorliegen, das andere Mal sollen sie fehlen.

ZACHARIAS (I) benutzte eine Lösung von je 0,5 g Methylenblau und Säurefuchsin in 500 ccm Wasser, in der ein Theil des ersteren nicht gelöst war, so dass die Mischung ungleichmässig war. Nucleinsäure, von GRÜBLER bezogen, war, nachdem sie 24 Stunden in dem Gemisch gelassen und dann mit Alkohol gewaschen worden war, tiefblau gefärbt, Hühnereiweiss rein roth. ZACHARIAS fällte weiterhin

Hühnereiweiss mit essigsaurer Nucleinsäurelösung dadurch, dass er diese auf einen Objectträger mit einem Tropfen Hühnereiweiss auftropfte. Der nicht gefällte Rest des Eiweisses, der die Nucleoalbuminfällung umgab, wurde mit Alkohol coagulirt. Das Nucleoalbumin blieb in der Mischung zuerst farblos und färbte sich dann blau, das reine Eiweiss dagegen sofort roth (I, p. 191).

Lilienfeld und Zacharias kommen also zu dem gleichen Resultat, dass chemische Präparate der Eiweisskörper sich electiv aus Farbgemischen färben, ebenso wie die einzelnen Theile eines Zellkörpers. Während aber Lilienfeld die Chromatophilie auf chemische Eigenschaften zurückführt, gewissermaassen als Sättigungsfärbungen betrachtet (acidophil und basophil), stellt sich dagegen Zacharias auf Auerbach's Standpunkt und meint, dass die nucleinartigen Stoffe (Nucleinsäure, bestimmte Theile des Lachsspermatozoons und des Zellkernes) aus einem Gemisch von Methylenblau-Säurefuchsin „den blauen Farbstoff aufspeichern, ohne vorher eine rothe Färbung anzunehmen" (I, p. 192). Daher erklärt Zacharias die starke Cyanophilie der Chromosomen (I, p. 194) aus ihrem Nucleinreichthum, der mikrochemisch festgestellt sei. Damit ist meiner Ansicht nach gar keine Erklärung gegeben, denn die räthselhafte, fast mystische Theorie Auerbach's von der cyanophilen und erythrophilen Färbung setzt doch nur an die Stelle einer klaren Thatsache ein unklares Wort.

Mit Biondi's Dreifarbengemisch hat Posner (I, p. 294, 295) ähnliche Versuche, wie die geschilderten, ausgeführt. Nuclein färbte sich blau, reine Nucleinsäure intensiv grün, Hühnereiweiss und Peptone reagirten, „wenn auch nicht sehr exquisit in der erwarteten Weise", d. h. sie färbten sich wahrscheinlich roth, was aber nicht besonders angegeben ist. Eiweiss (I, p. 296), mit Eosin allein intensiv roth gefärbt, war durch Nachbehandlung mit Methylenblau nicht mehr blau zu färben, während umgekehrt eine leichte primäre Blaufärbung sofort durch Eosin überdeckt wurde. Umgekehrt färbte das Eosin Nucleinsäure nur wenig, „unecht" und wurde durch Nachfärbung mit Methylenblau vollkommen gedeckt. Posner kommt zu dem üblichen Resultat: Eiweiss hält den sauren Farbstoff besonders fest und ist acidophil, verhält sich bei der Färbung wie eine Base; die Nucleinsäure ist entgegengesetzt, basophil. Auch Malfatti (citirt bei Zimmermann, IV, p. 23) hat Färbungsversuche, ähnlich denen von Lilienfeld und Zacharias, mit übereinstimmendem Erfolg ausgeführt.

Statt mit den Schollen und Klumpen der chemischen Präparate von Eiweisskörpern arbeitete Bogomolow (I) mit ihren, vorwiegend rein wässrigen Lösungen, die er mit einfachen Farblösungen zusammenschüttete, um aus etwaigen Nuanceänderungen eine Differentialdiagnostik der Eiweisskörper ableiten zu können. Diese Versuche eignen sich deshalb nicht zur Kritik der an fixirten Objecten auftretenden Färbungen, weil die Lösungen der Eiweisskörper ganz andere physikalische Eigenschaften haben als die fixirten Gewebselemente. Auch übersieht Bogomolow, dass in den zusammengemischten Lösungen oft Niederschläge entstehen, die doch wohl am ersten für die Färbungstheorie Bedeutung haben könnten.

Eine grössere Versuchsreihe mit Eiweisskörpern in Substanz und Farbgemischen, in denen beide Componenten entweder sauer oder basisch oder die eine sauer, die andere basisch waren, bestätigte mir zunächst, dass Eieralbumin schliesslich den

sauren, Nuclein den basischen festgehalten hatte, gleichviel ob roth oder blau. Ich nahm statt der im Wasser leicht zerfliessenden Nucleinsäure das unlösliche Nuclein, das sich ebenso verhielt. Die trockenen Schollen und Bröckelchen der Präparate wurden auf dem Objectträger unter dem Mikroskop mit den Farbmischungen zusammengebracht, um alle Einzelheiten verfolgen zu können. Das Endresultat war die Bestätigung der LILIENFELD'schen Angabe: Albumin acidophil, Nuclein basophil. Eine Auswahl des Farbstoffes nach der Wellenlänge des absorbirten Lichtes, Cyanophilie und Erythrophilie trat nicht ein. Eieralbumin färbte sich in einem Gemisch zweier saurer Farben, z. B. Säurefuchsin-Lichtgrün, genau in der Mischfarbe. Gemische von Fuchsin mit Methylenblau oder Methylgrün färbten das Nuclein zwar stets cyanophil und das Eieralbumin vorherrschend roth, aber die Ursache hierfür ist eine durchaus andere. In diesen beiden Mischungen nämlich ist das im Wasser überhaupt schwerer, als die blauen und grünen Antheile, lösliche Fuchsin zum Theil ausgefällt. Es ergibt sich hieraus eine complicirte Wirkung der ungleichen Concentration der beiden Componenten, die auch ungleich diffundiren. Mit den Klumpen und Schollen der chemischen Präparate lässt sich die ganze Feinheit dieses Färbungsvorganges nicht analysiren, dazu bedarf es der künstlichen Granula, weshalb erst später beim Methylgrün-Fuchsin Genaueres mitgetheilt werden kann.

Noch unbrauchbarer erweisen sich aber die Versuche mit den Eiweissschollen gegenüber der anscheinend chemischen Basophilie des Nucleins und der Nucleinsäure, in Gemischen aus sauren und basischen Farben. Die Fäbereipraxis benutzt zwar die Farbbasen in wässrigen Lösungen, aber nicht die Farbsäuren, die so nicht ihre höchste Färbkraft entfalten können. Zu Lichtgrün, Säurefuchsin u. a. muss Schwefelsäure, zu Eosin Alaun gesetzt werden, um in diesem sauren Bade die Färbkraft optimal zu machen. Eine rein wässrige Lösung von 0,1 Proc. Säurefuchsin und eine von 0,1 Proc. Methylenblau sind also gar nicht äquivalent in Rücksicht auf ihre Tinctionskraft, der saure Farbstoff ist stark gehemmt. Wollte man in einem Gemisch dieser beiden Farbstoffe Aequivalenz herstellen, dann müsste man Schwefelsäure zusetzen, durch die aber das Methylenblau gestört würde. Aber davon abgesehen, es würden auch die Schollen der Eiweisskörper durch den Säurezusatz verquellen oder gelöst werden. Daher ist diese Versuchsanstellung als unzureichend aufzugeben. An ihre Stelle haben die künstlichen Granula zu treten, die vor den Schollen noch den Vortheil haben, dass derselbe chemische Körper in ungleich grossen Körnern der Färbung mit Gemischen ausgesetzt werden kann.

Wenn man eine wässrige Lösung der anscheinend basophilen Nucleinsäure (aus Hefe) mit den einfachen Farblösungen vermengt, so wird man dadurch überrascht, dass alle basischen Farben sofort dicke Niederschläge geben, alle sauren klar bleiben. Es scheint, als ob die basophile Nucleinsäure nur mit den Farbbasen unlösliche Verbindungen einginge und dass hierauf wohl auch die elective Färbung chemisch beruhen könne. Würde man dieselben sauren Farben (0,1-proc. Säurefuchsin, Lichtgrün, Indulin, Eosin) mit einer wässrigen Lösung von Serumalbumin (1 Proc.) oder einer schwach sauren Lösung von Casein (1 Proc.) zusammengiessen, so würden ebenfalls keine Niederschläge entstehen; nur das Säurefuchsin würde im Albumin einige leichte Gerinnselchen abscheiden.

Alle basischen Farben aber (0,1-proc. Fuchsin, Safranin, Methylgrün, Gentiana) fällen meist sofort, sicher in 15 Minuten das Albumin und das Casein flockig aus. Die Niederschläge sind mehr oder weniger gefärbt und gleichen sonst durchaus den durch Fixirungsmittel erzeugten schollig-faltigen, gerinnseligen Fällungen. Die für die Nucleinsäure so schön zutreffende Parallele zwischen Basophilie und Ausfällung durch Farbbasen wird hier durchkreuzt; dieselben Farbbasen fällen auch das „acidophile" Albumin, das dagegen von den Farbsäuren nicht abgeschieden wird, auch nach mehr als 20 Stunden nicht. Es bestehen also sicherlich keine so einfachen Beziehungen zwischen Chromatophilie und Fällbarkeit durch die zusagende Farbe. Ausserdem sind diese Fällungen gar keine chemischen, sondern nur physikalische, theils einfache Aussalzungen der Eiweisskörper durch die Farbdoppelsalze, denen ja meistens Chlorzink angehängt ist. Theils wird die physikalische Fällung aber dadurch bedingt, dass die Eiweisskörper in den Anilinfarblösungen unlöslich sind. Dass die sauren Farben nicht so wirken, muss einstweilen als Thatsache hingenommen werden, die verwickelter dadurch wird, dass eine 5-proc., eben saure Lösung von Deuteroalbumose sowohl mit den sauren als den basischen Farben sofort oder innerhalb der ersten Stunde Niederschläge von verschiedenem Aussehen und Umfang gibt. Nur mit Methylenblau und Methylgrün war innerhalb 20 Stunden nicht die leiseste Trübung zu bemerken. Auch diese Albumoseniederschläge haben für die Theorie der Färbung nicht die Bedeutung, wie es zunächst scheinen könnte. Aus Eosin wird schon durch schwache Säure die gelbrothe, in Wasser fast unlösliche Tetrabromfluorescinsäure abgespalten, die aber leicht durch schwache Alkalien wieder zu Eosin sich regeneriren lässt. Nur diese Farbsäure ist es, die die geringe Säure unserer Albumoselösung ausgefällt hatte, denn der gelbrothe, in Wasser unlösliche Niederschlag löst sich durch schwache Lauge augenblicklich. Schwach alkalische Albumoselösungen bleiben mit 2 Proc. Eosin in reichem Ueberschuss tagelang ganz blank, eine chemische, unlösliche Verbindung entsteht sicher nicht.

Anderer Art ist der roth gefärbte Niederschlag mit Safranin. Er ist klebrig, haftet fest am Gefäss und zerfliesst in Wasser, dabei schaumig-vacuolig werdend, wie die Alkoholfällung der Albumose. Nur diese ist hier physikalisch gefällt und secundär mit Safranin imprägnirt, die Albumose ist in Safranin unlöslich. Hierauf wird wohl die Fällung allgemein zurückzuführen sein. Man verlangt hier vielleicht eine quantitative Analyse zum sicheren Beweis dafür, dass wirklich keine chemischen Verbindungen zwischen den Eiweisskörpern und den Farbstoffen entstanden sind. Aus zwei Gründen kann das unterbleiben. Erstens hat die histologische Färbung es nicht mit gelösten Eiweisskörpern zu thun, sondern mit den fixirten, die doch durchweg in ganz unlösliche Körper umgewandelt worden sind. Zweitens fehlt aber, wie schon hervorgehoben, eine ausreichende Uebereinstimmung zwischen Chromatophilie und Fällbarkeit, so dass, selbst wenn man bewiese, dass Safranin mit Nucleinsäure sowohl, als auch mit Albumin sich chemisch verbinden kann, erst recht die chemische Theorie der Färbung in unlösbare Widersprüche geriethe. Würde sich herausstellen, dass einige Niederschläge chemische Verbindungen, andere nur physikalische Fällungen seien, so würde daraus auch nichts abzuleiten sein.

3. Niederschläge von Eiweisskörpern mit Fixirungsmitteln.

Granula und Gerinnsel.

Nachdem sich ergeben hat, dass weder die natürlichen Objecte, noch die Eiweisskörper in Substanz oder Lösung geeignet sind, durch ihr Verhalten zu Farbstoffen den Färbungsvorgang theoretisch aufzuklären, sind die Vortheile hervorzuheben, die eine Untersuchung der künstlichen Granula und Gerinnsel gewährt. Der erste Vorzug ist in der grossen Annäherung an das natürliche Object zu erblicken: wie in diesem, Eiweisskörper in ähnlicher Ablagerungsform, durch dieselben Fixirungsmittel zur Färbung vorbereitet. Zweitens wird aber das natürliche Object wesentlich übertroffen dadurch, dass der Ausgangspunkt zwei reine chemische Körper sind, die Eiweisslösung und das Fixirungsmittel, deren Einwirkung auf einander entweder durch makrochemische Untersuchungen bereits bekannt ist oder aus ähnlichen sich erschliessen lässt, im Nothfall durch neue Analysen sich ermitteln liesse. Nicht alle durch Fixirungsmittel erzeugte Niederschläge aus Eiweisslösungen sind neue chemische Verbindungen zwischen beiden, ein Theil gehört zu den physikalischen Fällungen, hervorgerufen durch die Unlöslichkeit des Eiweisskörpers im hinzugegossenen Fixirungsmittel. Hierher sind sicher zu rechnen die Fällungen mit Alkohol, der nach Hofmeister (IV, p. 189) durch die Coagulation „ebensowenig eine Abspaltung als eine Addition fremder Moleculgruppen“ bewirkt. Sicher entstehen aber neue chemische Körper bei der Behandlung der Eiweissstoffe mit den Verbindungen schwerer Metalle, wie Platin- und Quecksilberchlorid, Osmium- und Chromsäure, Kaliumbichromat und den entsprechenden Gemischen. Die physiologische Chemie (Neumeister, III, p. 28) erblickt in der Fällung der Eiweisskörper durch Schwermetallsalze einen Austausch von deren Säure gegen die als schwache organische Säure zu betrachtenden Eiweisskörper und redet demgemäss von Kupferalbuminat, Platinalbuminat u. dergl. An diese Anschauung hat man sich zu halten, und daher war ich (III, p. 5) im Recht, eine Fällung von Deuteroalbumose durch Hermann's Gemisch als Platinosmiumalbumose zu bezeichnen. Ebenso correct ist es, von Platinalbumose (gefällt mit Platinchlorid), Quecksilberalbumose zu sprechen. Nach Analogie darf man schliessen, dass auch die Granula, die man durch Fällung von Deuteroalbumose mit Kaliumbichromat erzeugt, aus einer neuen, unlöslichen Verbindung bestehen, in der, ähnlich wie es die Chemie für die Pikrin- und Gerbsäurefällungen der Eiweisskörper annimmt (Neumeister, III, p. 30), diese die Rolle einer Base spielen. Es würde also ein Albumosechromat, ein Albumosepikrat, -tannat entstehen. Wir wissen demnach, was wir färben. Wir wissen auch, dass wir einheitliche Körper färben, während die geformten Theile des natürlichen Objectes aus unbekannten Gemischen zusammengesetzt sein können.

Ein dritter Vorzug endlich entspringt der Möglichkeit, denselben chemischen Körper in verschiedener Grösse des Kornes der Färbung zu unterwerfen. Ich hatte bereits früher (III, p. 6) diesen Vortheil benutzt, um zu zeigen, dass die Chromatophilie bei Differenzirungsfärbungen nur von den durch die verschiedene Korngrösse gegebenen physikalischen Differenzen abhinge, nicht chemisch sei. Paul Meyer (I, p. 321) hat dagegen Einspruch erhoben und verlangt, „da er kritischer sei“ als ich und meine übrigen Leser, dass ich durch eine chemische

Analyse beweise, was ich nur voraussetze. Zunächst bedaure ich, dass Mayer meine Ausführung nicht ganz beachtet hat und dass ich daher genöthigt bin, sie hier zu wiederholen, obgleich sie durch neuere Versuche bereits weit überholt ist. Es wurden damals eine 3- und eine 0,3-proc. Deuteroalbumose durch Hermann's Gemisch gesondert gefällt und die winzigen Granula der einen (0,3-proc.) mit den grösseren der anderen (3-proc.) auf dem Deckglas gemischt und angetrocknet. Auf diese Weise, sagte ich, erhält man „ein Präparat desselben chemischen Körpers, Platinosmiumalbumose, mit verschiedenen physikalischen Eigenschaften, bedingt durch die verschiedene Grösse der Granula". Das wurde vorausgesetzt, nicht, wie Mayer wünscht, analytisch bewiesen, was vielleicht verlangt werden könnte. Nun setzt aber Mayer's Missverstehen meiner weiteren Beweisführung ein, die ohne den verlangten analytischen Beweis vollkommen ausreicht, um das zu zeigen, was gezeigt werden sollte. Es wurden nämlich (III, p. 6) in der von Flemming eingebürgerten Reihenfolge die Präparate zuerst mit Safranin gefärbt, dann mit Säurealkohol so lange differenzirt, bis nur die grossen Granula noch roth gefärbt waren, und dann die entfärbten kleinen mit Gentiana nachgefärbt. Alle grossen Granula waren jetzt safranophil, die kleinen gentianophil. Kehrte man aber die Farbstofffolge um, was Mayer (I, p. 321) gar nicht berührt, begann mit dem Gentiana, differenzirte und liess das Safranin den Schluss bilden, so waren dieselben grossen Granula, die vorher safranophil sich verhalten hatten, gentianophil gefärbt, die kleinen safranophil. Hier war doch, genau wie in den zugleich angeführten Inversionsfärbungen der Mitosen, der Beweis, dass Doppelsalzbildungen oder dergleichen ausgeschlossen waren, gar nicht nöthig, denn die Granula gleicher Grösse, an deren gleicher Zusammensetzung doch niemand zweifeln kann, färbten sich nach meinem Belieben roth oder violett (III, p. 6, Taf. III, Fig. 54, 55). Für diese, von Mayer gar nicht gewürdigte Beweisführung muss ich sein Verlangen nach einer Analyse entschieden als ganz überflüssig und unberechtigt zurückweisen. Sollte Mayer etwa meinen wollen, dass die grossen Granula aus Doppelverbindungen aufgebaut sind, von denen die eine safranophil, die andere gentianophil ist, so müsste doch bei jeder Reihenfolge der Farbstoffe diese Mischnatur in einer Mischfärbung zum Ausdruck kommen. Davon ist aber nichts zu sehen, die Färbungen sind rein einfarbig. Ich kann Mayer nur so verstehen, dass er es im Allgemeinen gern sehe, wenn ich ihm quantitativ bewiese, dass die grossen und kleinen Granula aus demselben Stoff bestehen. Das ist nun leider nicht möglich, weil, wie nach p. 36 zu erwarten ist, aus einer 3-proc. Deuteroalbumoselösung nicht lauter genau gleichgrosse Granula gefällt wurden, sondern neben vorherrschenden grossen auch alle Uebergänge bis zu den winzigsten. In noch höherem Maasse gilt dies für die Fällungen aus 40-proc. Albumose, die bei den folgenden Versuchen benutzt wurden. Man müsste, um Mayer's kritischerer Beanlagung gerecht werden zu können, die gleichgrossen Granula unter der Oelimmersion heraussuchen und analysiren. Es würde das z. B. für diejenigen Granulagemische, die in der auf p. 38, 39 beschriebenen Weise mit Kaliumbichromat oder Platinchlorid gezüchtet worden sind, 10—15 Analysen erfordern, da sich so viele Grössenordnungen von Granulis bequem unterscheiden liessen. Glaubt Mayer wirklich, dass jede Grössenkategorie, die doch ihr bestimmtes Färbungsverhalten zeigt, aus einer anderen Verbindung mit besonderen chemisch-färberischen

Eigenschaften besteht? Denn eine Analyse der Fällung im Allgemeinen würde doch Mayer's Einwand nicht gerecht werden, auch dann nicht, wenn sich eine Constanz des Platingehaltes ergäbe, etwa wie bei der von Miescher (III, p. 365) analysirten Platinfällung des Protamines, der im Lachssperma enthaltenen, an die Salmonucleinsäure gebundenen Nucleinbase. Miescher erhielt folgenden Platingehalt: 24,07, 24,05, 24,01, 24,05, 24,04, 24,11, 24,16, und bei einem anderen Präparat (III, p. 366), das schärfer getrocknet war: 24,65, 24,74, 24,36. Hier herrscht also eine ausreichende Gleichförmigkeit, die sicher auch eine Analyse der Platinalbumose ergeben würde, freilich nur des Granulagemisches. Da Mayer einmal diese ganze Frage aufgewirbelt hat, so muss ich mich noch der Mühe unterziehen und ihm zu beweisen versuchen, dass alle Granula eines solchen Gemisches, z. B. der Platinchloridfällung, wirklich aus derselben Substanz, Platinalbumose, bestehen. Durch eine quantitative Analyse geht das freilich nicht, und wir müssen uns auf Umwegen Mayer's Beifall erschleichen. Zu diesem Zwecke wird in 3 Petri-Schalen 40-proc. Deuteroalbumose in 20 Stunden gefällt mit 1-, 5- und 10-proc. Platinchlorid, die Niederschläge werden nach gründlichem Auswaschen auf Deckgläschen angetrocknet und mit einer Mischung von 10 ccm 0,5-proc. Methylgrün und 3 Tropfen 0,1-proc. Fuchsin (heiss gelöst) 8 Minuten lang gefärbt. Die Fällung mit 1-proc. Platinchlorid besteht aus lauter kleinen und mittleren Granulis (0,4 bis 3 μ Durchmesser, Taf., Fig. 23), zwischen die nur ganz vereinzelt und selten ein sehr grosses eingesprengt ist, so dass man oft längere Zeit suchen muss, um ein solches zu finden. Nur diese sehr seltenen Solitäre sind intensiv blaugrün gefärbt, alle anderen rein roth. Nach Mayer würden wir also zwei chemische Verbindungen vor uns haben, die fuchsinophile, in kleinen und mittleren Granulis abgelagert, und die cyanophile der sehr seltenen grossen Körner. Die Fällung mit 5-proc. Platinchlorid ist aus mittelgrossen Granulis (0,7—3 μ) zusammengesetzt, zwischen die vereinzelt winzige Körnchen eingeschoben sind. Mit Methylgrünfuchsin färbt sich alles rein roth, sehr selten taucht ein blaues Riesenkorn auf. Bei 10-proc. Platinchlorid erscheinen schon öfter grosse blaue Körner, aber selten sind sie doch immer noch, die Hauptmasse der kleinen und mittelgrossen Granula ist roth gefärbt (Taf., Fig. 22). Alle drei Concentrationen des Platinchlorides haben also vorherrschend fuchsinophile kleine und mittlere Granula gefällt, zwischen die vereinzelte grosse und cyanophile sich einlagern. Um mit Mayer zu reden, wird also trotz der verschiedenen Concentrationen des Platinchlorides, die doch verschiedene Doppelverbindungen erzeugen könnten, eine recht gleichartige Chromatophilie der Niederschläge erzeugt. Die durchschnittliche Korngrösse wächst mit der Concentration des Fällungsmittels, die maximalen Granula aber haben annähernd die gleiche Frequenz. Die zweite „cyanophile Verbindung" ist selten. Wenn man nun aber die trübmilchige Flüssigkeit, in die sich 40-proc. Deuteroalbumose in 20 Stunden mit 1-proc. Platinchlorid verwandelt hat, von dem geringen Bodensatz abgiesst und mit 10-proc. Platinchlorid 20 Stunden nachfällt, wie p. 39 schon beschrieben, so bekommt man eine neue Granulamischung, in der die grossen cyanophilen Granula sehr häufig sind, umgeben von kleinen und mittleren rothen (0,4—10 μ Durchmesser, Taf., Fig. 21). Diese neue Fällung, kurz als (1 + 10) $PtCl_4$ bezeichnet, enthält also viel mehr von der cyanophilen Verbindung im Sinne Mayer's. Wie soll sie entstanden sein?

Es wurde die durch 1-proc. $PtCl_4$ nur partiell ausgefällte Albumose, die durch die schwebenden winzigen Granula milchig getrübt war, durch 10-proc. Platinchlorid gänzlich ausgefällt. Dadurch war den Granulis der ersten partiellen Fällung Gelegenheit gegeben, zu grossen heranzuwachsen, während gleichzeitig neue kleine Granula sich abschieden (p. 39). So entstand die zu Chromatophilie-Versuchen äusserst geeignete Mischung mit viel grossen und viel kleinen Granulis und reichlichen Uebergängen zwischen ihnen. In Methylgrünfuchsin sind alle grossen blau, die anderen roth gefärbt, die cyanophile Verbindung, so würde Mayer schliessen, hat sich bedeutend vermehrt, nur ist es auffallend, so würde vielleicht selbst Mayer hinzufügen müssen, dass immer nur die grossen Granula sich blau färben, die kleineren stets und ganz ausnahmslos roth. Von einer gewissen Korngrösse abwärts wird man bei gründlichster Absuchung vieler Präparate kein einziges blaues Granulum finden. Vergleicht man mit dem Niederschlage $(1 + 10)$ $PtCl_4$ den sogleich mit 10-proc. $PtCl_4$ erzeugten (Taf., Fig. 21 und 22), so wird der Unterschied sofort in die Augen springen, hier die blauen Granula nur vereinzelt, dort reichlich überall eingestreut zwischen die kleinen rothen. Beidemale waren die Albumose und ihre Granula 20 Stunden lang der Einwirkung von 10-proc. $PtCl_4$ ausgesetzt, die Gelegenheit zur Entstehung von mehreren Verbindungen war also beidemale gegeben, der Unterschied war nur der, dass bei $(1 + 10)$ $PtCl_4$ eine dünne, 1 Proc. Lösung des Fällungsmittels bereits 20 Stunden gewirkt hatte. Sie allein reicht nur hin, sehr vereinzelte grosse, cyanophile Granula zu erzeugen, es bedarf also, so müsste man schliessen, eines concentrirteren $PtCl_4$. Nimmt man aber davon sogleich 10 Proc., so sind nicht viel mehr solche grosse, cyanophile Granula vorhanden als bei 1-proc., und die höhere Concentration des $PtCl_4$ allein ist sicher nicht die Ursache, dass bei $(1 + 10)$ $PtCl_4$ viele grosse Granula sich abscheiden. Diese cyanophilen Granula können daher nicht aus einer anderen Verbindung als die kleinen erythrophilen bestehen, etwa in der Weise, dass im Molekel mehr Platin enthalten wäre als bei den kleinen. Denn wenn das richtig wäre, so müsste doch 10-proc. $PtCl_4$ sogleich sehr viele Granula der cyanophilen Verbindung abscheiden, jedenfalls viel mehr als 1-proc. oder auch als 5-proc. Davon ist nichts zu sehen, die grössere Frequenz der cyanophilen und grossen Granula in der $(1 + 10)$ $PtCl_4$-Fällung beruht nicht darauf, dass mehr von der cyanophilen Verbindung entstanden ist, sondern einfach darauf, dass diese Methode das Wachsthum der sphärokrystallinischen Granula begünstigte. Die grossen, cyanophilen Granula bestehen aus derselben Substanz, Platinalbumose, wie die kleinen, fuchsinophilen, und ihre elective Färbung aus Methylgrünfuchsin ist nur die Folge der durch die verschiedene Grösse gegebenen physikalischen Differenzen. Das soll später genau ausgeführt werden. Ob Mayer durch obige Ausführung beruhigt ist, muss ich geduldig abwarten, ich hoffe aber wenigstens, dass Mayer's Leser es sein werden.

Wer durch diese Auseinandersetzung überzeugt ist, wird mir auch beistimmen, dass ich die ungleich grossen Granula der Fällungen mit Chromsäure, Kaliumbichromat, 10-proc. Formol und den oft genannten Mischungen ebenfalls nur als verschieden grosse Sphärokrystalle derselben chemischen Albumoseverbindung auffasse und zu färbungstheoretischen Versuchen unter dieser Annahme verwende. Dasselbe gilt für die mit $(1 + 10)$ $PtCl_4$ erzeugte Mischfällung der Thymus-

nucleinsäure (p. 44). Es ist noch auf einen weiteren Vortheil der künstlichen Granula hinzuweisen. Sie zeigen, wie derselbe Eiweisskörper, z. B. Deuteroalbumose, durch verschiedene Fixirungsmittel mit besonderen chromatophilen Eigenschaften ausgestattet wird, was doch für die Kritik gefärbter Präparate von fundamentaler Bedeutung sein muss. Aber selbst ein und dasselbe Fixirungsmittel verleiht, wie schon das vorläufige Beispiel gezeigt hat, demselben Stoff eine verschiedene Chromatophilie, was sich nicht wegleugnen lässt, auch wenn man die chemische Gleichheit der grossen und kleinen Granula bestreiten wollte. Es sei schon jetzt darauf hingewiesen, dass man sogar die ALTMANN-sche Granulafärbung umkehren kann, wenn man mit einem Gemisch von Säurefuchsin-Pikrinsäure auf einmal färbt (Taf., Fig. 11 und 12). Die folgende Darstellung wird noch oft genug die Vortheile der künstlichen Granula und Gerinnsel hervorzuheben haben und schliesslich jeden davon überzeugen, dass sie allein für eine Begründung der Färbungstheorie geeignet sind.

Kapitel II. Das Auswaschen der Fixirungsmittel und seine Bedeutung für die Färbungstheorie.

1) Färbung nicht ausgewaschener Granula. Es ist eine allbekannte Thatsache, dass gar nicht oder schlecht ausgewaschene Fixirungsmittel die Tinctionsfähigkeit der natürlichen Objecte sehr herabsetzen und vielleicht ganz aufheben; man weiss auch weiterhin, dass manche Fixirungsmittel, wie der Alkohol, nicht so wirken. Dieselbe Erscheinung kann man an den Granulis und Gerinnseln beobachten.

In der Literatur wird zwar das Auswaschen stets angelegentlichst empfohlen, aber nirgends der principiellen Bedeutung gedacht, die es für die Theorie hat. Um an den Granulis die Färbungshemmung durch nicht ausgewaschene Fixirungsmittel noch besonders vorzuführen, sei auf folgende Tabelle (p. 85) verwiesen, in der 0 bedeutet, dass gar keine Färbung, ++, dass annähernd optimale, +, dass eine mehr oder weniger starke, aber sicher nicht optimale Färbung eingetreten war. Die Niederschläge wurden ohne Wasserzusatz mit dem anhaftenden Fixirungsmittel auf Deckgläser angetrocknet und dann ca. 10 Secunden lang unter die Wasserleitung gehalten, um die Reste der Fixirungsmittel vom Deckglas zu entfernen. Ein Auswaschen der Granula war durch so kurze Berührung mit Wasser nicht zu befürchten.

Zunächst sei für etwaige Wiederholung dieser Versuche bemerkt, dass die mit 0 eingeschriebenen Präparate bei flüchtiger Betrachtung ein solches Prädicat nicht zu verdienen scheinen, denn schon dem blossen Auge erscheinen die Deckgläser intensiv gefärbt, und auch unter der Oelimmersion und in Canadabalsam sehen die Granula oft so aus, als ob sie schwach gefärbt wären. Stellt man aber genau das Centrum der Granula ein, so wird man sich leicht davon überzeugen, dass sie nicht durchgefärbt sind, dass nur auf ihrer Oberfläche ein feiner Niederschlag, ein dünnes Häutchen des Farbstoffes sich abgesetzt hat, weshalb bei gewisser Einstellung natürlich das ganze Granulum schwach durchgefärbt erscheint. Besonders können

Färbung nicht ausgewaschener Granula.
40-proc. Deuteroalbumose gefällt mit:

Farblösung 0,5-proc. Färbzeit 10 Minuten	Platinchlorid 10-proc.	Sublimat 7-proc.	Chromsäure 2,5-proc.	Kalium-bichromat 2,5-proc.	FLEMMING-sche Lösung	HERMANN-sche Lösung	Formaldehyd 10-proc.	Tannin 2-proc.
1) Säurefuchsin	0	+	+ +	+ +	0	0	+ +	0
2) Lichtgrün	0	+ +	0	0	0	0	+ +	0
3) Eosin	0	+ +	+ +	+ +	+ +	0	+ +	0
4) Fuchsin	0	+ +	0	0	0	0	+ +	0
5) Methylgrün	0	blass	0	0	0	0	+ +	0
6) Safranin	0	„	0	0	0	0	+ +	0
7) Methylenblau	0	„	0	0	0	0	+ +	0
8) Eosinophiles Gemisch EHRLICH's	—	—	+ nur gelb-orange, kein Indulinton	+ nur rein orange	—	—	—	—
9) Triacid-Gemisch EHRLICH's	—	—	+ nur gelbroth oder roth, nirgends Methylgrünton	+ nur gelbroth, kein Methylgrün	—	—	—	—

solche Fixirungen, wie die HERMANN'sche, die dunkle Granula liefern, die aufgelagerte dünne Farbschicht viel intensiver erscheinen lassen, als sie wirklich ist, so dass die Granula zunächst total gefärbt erscheinen. Aber auch hier ist der wahre Sachverhalt leicht aufzudecken. Alle solche reine Oberflächenfärbungen sind mit 0 eingestellt, denn eine Speicherung des Farbstoffes im Innern fehlt stets vollkommen. Die Tabelle würde noch dahin zu ergänzen sein, dass nicht das Formaldehyd das einzige Fixirungsmittel ist, das die Färbung nicht schwächt, sondern das, wie allbekannt, auch der Alkohol und die Essigsäure hierher gehören. Neben dem Formaldehyd ist noch das Sublimat zu beachten, das stets Färbung gestattet, freilich mit einigen Farben nur eine blasse (No. 5—7). Dieser einen Gruppe stehen Platinchlorid, HERMANN'sche Lösung und das wegen späterer Versuche mitangeführte Tannin gegenüber, die jede Färbung unterdrücken. Merkwürdig wirken die chromhaltigen Fixirungsmittel, die eine optimal erscheinende Färbung mit Eosin und Säurefuchsin gestatten, die anderen Farben aber ganz absperren (vergl. auch No. 8 und 9). Wir würden daher 3 Gruppen der Fixirungsmittel zu unterscheiden haben.

1) Indifferente, die kein Auswaschen verlangen: Alkohol, Formaldehyd, Essigsäure; nahezu indifferent Pikrinsäure.
2) Partielle Farbfeinde: Chromsäure, Kaliumbichromat, FLEMMING'sche Lösung, Sublimat.
3) Totale Farbfeinde: Platinchlorid, HERMANN'sche Lösung, Tannin, zu denen nach anderen Versuchen, die später erwähnt werden sollen, noch Osmiumsäure, ALTMANN'sche Lösung, Jodalkohol zu stellen sind.

Die Gruppen 2 und 3 verlangen sorgfältiges Auswaschen, wie allgemein bekannt ist. Pikrinsäure (nach anderen Versuchen) ist als nahezu indifferent zu bezeichnen, was auch mit einer Bemerkung bei

Rawitz (I, p. 22), nach der nicht ausgewaschene Pikrinsäure die Tinction nicht beeinträchtigt, übereinstimmt.

2) Fällung der Farblösungen durch die Fixirungsmittel. Um zu entscheiden, worauf die farbfeindliche Wirkung der nicht ausgewaschenen Fixirungsmittel beruht, war es zunächst nöthig, sie in Probirröhrchen mit den Farblösungen zusammenzubringen. Hätte sich hierbei eine gewisse Gesetzmässigkeit ergeben derart, dass die totalen Farbfeinde alle Farben fällen, die partiellen nur diejenigen, denen sie die Aufnahme in die Granula versperren, die indifferenten endlich gar keine, so würde ja die soeben geschilderte Erscheinung leicht sich erklären. An der Oberfläche der mit den Fixirungsmitteln beladenen Granula würden die Farbstoffe ausgefällt und ihnen so der Weg ins Innere verlegt. Es könnte der Niederschlag einer chemischen Zerlegung des Farbstoffes entsprechen, wie z. B. zwischen Fuchsin und Gerbsäure, die gerbsaures Rosanilin, das in Wasser unlöslich ist, ausfällt (Nietzki I, p. 130); oder wie Eosin, aus dem durch Säure das unlösliche, gelborange Tetrabromfluorescin abgeschieden wird. Der Niederschlag könnte aber auch ein unlösliches Doppelsalz sein, wie z. B. bei Safranin mit Platinchlorid. Die folgende Tabelle wird im Vergleich zu der auf p. 85 mitgetheilten zeigen, dass auf solchen Fällungen die Färbungsverhinderung durch die Fixirungsmittel nicht beruhen kann. Es bedeutet 0 keine Fällung oder sonstige Veränderung innerhalb 20 Stunden, + Fällung, die entweder sofort oder in kurzer Zeit erscheint.

Farblösung 0,1-proc.	Platinchlorid 1-proc.	Sublimat 7-proc.	Chromsäure 0,5-proc.	Pikrinsäure 0,5-proc.	Tannin 2-proc.	Formaldehyd 4-proc.	Osmiumsäure 1-proc.
1) Pikrinsäure	0	0	0	—	0	0	0
2) Säurefuchsin	0	0	0	0	0	0	0
3) Lichtgrün	0 klar, aber schmutzig violett	0	0	0	0	0	0
4) Indulin	0	0	+	0	0	0	0
5) Eosin	+	0	+	+	0	0	0
6) Fuchsin	+	+	+	+	+	0	0
7) Methylgrün	+	+	+	+	+	0	0
8) Safranin	+	+	+	+	+	0	0
9) Methylenblau	+	+	+	+	+	0	0

Das indifferente Formaldehyd, das keinen einzigen Farbstoff ausfällt, könnte zunächst den Anschein hervorrufen, als ob wirklich darauf seine Indifferenz beruhte. Unterstützt würde dieser Schein durch den indifferenten Alkohol, in dem ja alle Farbstoffe der Tabelle löslich sind, und auch durch das gleiche Verhalten dünner Essigsäure. Aber schon das Sublimat durchkreuzt die scheinbare Regel. Noch schlimmer sieht es um Tannin aus, das nur die basischen Farbstoffe fällt, als deren Gruppenreagens es daher benutzt wird. Trotzdem dass die sauren Farbstofflösungen vollkommen klar bleiben, ist doch ihnen gegenüber das Tannin ein totaler Farbfeind. Nahezu genau so verhält sich das Platinchlorid, das unter den sauren Farbstoffen nur das Eosin fällt, aber allen anderen und ebenso allen Farbbasen den

Eintritt in die nicht ausgewaschenen Granula versperrt. Die Chromsäure, der sich das nicht besonders angeführte Kaliumbichromat vollkommen anschliesst, fällt das Eosin, aber nicht das Säurefuchsin, und trotzdem färben sich nicht ausgewaschene Chromgranula mit beiden Farbstoffen fast so intensiv wie nach gründlichem Auswaschen. FLEMMING's und HERMANN's Gemisch reagiren auf die Farblösungen so wie ihre eine Componente, Chromsäure resp. Platinchlorid, denn die Osmiumsäure allein fällt nach der Tabelle keinen der vier basischen Farbstoffe, die mit den Mischungen sofort sich trüben. Nach dem Mitgetheilten besteht also keine Beziehung zwischen der Farbfeindlichkeit nicht ausgewaschener Fixirungsmittel und ihrem Verhalten zu den Farblösungen im Reagensrohr. Die Bedeutung des Auswaschens kann mithin nicht darauf beruhen, dass der chemische Einfluss der überschüssigen Fixirungsmittel beseitigt wird.

3) Die Bedeutung des Auswaschens wird sich von selbst ergeben, so bald man sich klar zu machen versucht, in welcher Weise die auswaschbaren Mengen der Fixirungsmittel in den Granulis und den natürlichen Objecten gebunden sein können. Ist die Fixirung und Fällung nur eine physikalische, so kann natürlich das Fixirungsmittel nur physikalisch festgehalten, nur adsorbirt sein. Dieser Fall interessirt uns wenig, weil die meisten Fixirungen chemische sind. Da das Fixirungsmittel stets im Ueberschuss dargeboten wird, so ist es zunächst zweifellos, dass die Albumose, oder das lebende Object, sich chemisch vollkommen damit sättigen und dass der zum weiteren Bestand der neuen, unlöslichen Verbindung erforderliche Antheil des Fixirungsmittels unauswaschbar festgehalten wird. Denn könnte er durch Wasser entfernt werden, so wäre die neue Verbindung, z. B. die Platinalbumose oder das Albumosechromat, in Wasser nicht unlöslich. Das ist aber sicher der Fall, denn selbst wochenlanges Liegen in Wasser verändert weder die Form noch die Färbungseigenschaften der Granula. Der auswaschbare Rest des Fixirungsmittels kann daher gar nicht chemisch gebunden sein, er ist chemisch vollkommen überschüssig und ist nur adsorbirt. Ist das Object vollkommen ausgewaschen, das adsorbirte Fixirungsmittel ganz entfernt, dann hat es seine optimale Tinctionsfähigkeit. Ein weiteres Auswaschen würde sie bei unlöslichen Granulis nicht mehr steigern können. Da nun gar nicht ausgewaschene Granula, wenn sie mit total farbfeindlichen Fixirungsmitteln hergestellt sind, sich gar nicht färben, da ferner die chemische Wirkung dieser auf die dargebotenen Farbstoffe nicht die Ursache der Unfärbbarkeit ist, so kann nur eine Erklärung die richtige sein. Das rein physikalisch gebundene, adsorbirte Fixirungsmittel versperrt dem Farbstoff den Platz, weil es alle Adsorptionsaffinitäten des Granulums sättigt und unwirksam macht. Wäscht man aber die adsorbirten Fixirungsmittel aus und entfesselt damit das Adsorptionsvermögen des Granulums, so färbt es sich sofort und sättigt aufs Neue, nunmehr mit dem Farbstoff, seine mechanischen Affinitäten. Sie zu befreien, ist der wahre und einzige Zweck des Auswaschens, mit dessen Fortschreiten bekanntlich das Tinctionsvermögen der Objecte gradweise zunimmt. An dieser Stelle könnte unmittelbar die physikalische Theorie der Färbung, die schon vollkommen gefestigt dasteht, ein-

setzen. Sie soll aber erst noch durch weiteres Beweismaterial vorbereitet werden.

Allbekannt ist es, dass manche Fixirungsmittel leicht, andere schwer sich auswaschen, leicht z. B. Platinchlorid, schwerer Chromsäure (oft sehr schwer) und Kaliumbichromat, die Mischungen Flemming's, am schwersten Hermann's und Altmann's Gemisch. Man erkennt das einerseits an dem langsameren Eintritt der optimalen Färbbarkeit oder auch schon am Aussehen der Objecte. Diese allbekannte Erscheinung beweist, dass die verschiedenen Fixirungsmittel ungleich stark adsorbirt sind. Platinchlorid, Chromsäure, die in Wasser sehr leicht löslich sind, waschen sich auch mit Wasser ziemlich schnell aus, dagegen ist die in Wasser schwer lösliche Pikrinsäure mit Wasser auch nur sehr langsam auswaschbar. Wollte man hieraus auf die Kraft schliessen, mit der sie absorbirt ist, so würde man das Adsorptionsvermögen der natürlichen Objecte weit überschätzen, was man sofort erkennt, wenn man ein besseres Lösungsmittel, z. B. Alkohol, zum Auswaschen wählt. *Aber nicht allein das active Adsorptionsvermögen der fixirten Objecte bestimmt die Zähigkeit, mit der die überschüssigen Fixirungsmittel festgehalten werden.* Es kommt noch der *passive Adsorptionscoefficient der einzelnen Fixirungsmittel* in Betracht, der recht verschieden gross ist, genau auch wie für andere Stoffe z. B. Thierkohle gegenüber. Eine *Resultante aus dem activen Adsorptionsvermögen der Granula* und dem *passiven Adsorptionscoefficienten des Fällungsmittels* hat man in seiner leichten oder schweren Auswaschbarkeit zu erblicken.

Nachdem alles dies festgestellt ist, drängt sich sofort ein Versuch auf, der gewissermaassen ein Experimentum crucis ist. Es müsste gelingen, durch Auswaschen optimal färbbar gewordene Granula durch abermaliges Einlegen in ihr Fällungsmittel wieder zu verstopfen. Ebenso müsste das auch mit anderen Fixirungsmitteln gelingen und besonders mit allen schwer auswaschbaren. In der That gelingen diese Versuche, die in anderem Zusammenhange im Kapitel VI mitgetheilt werden sollen, ausgezeichnet. *Die indifferenten Fixirungsmittel*, die fast gar nicht adsorbirt werden, *verstopfen auch bei nachträglicher Imprägnirung beliebige Fällungsgranula nicht, die partiellen Farbfeinde* verstopfen nur *gemäss ihren Eigenschaften*, und nur *die totalen verstopfen auch wirklich total.* Durch erneutes Auswaschen ist das alte Farbvermögen wieder herzustellen, wie später besprochen werden wird. Nur auf einen Punkt sei hier schon hingewiesen. Dasjenige Fixirungsmittel, mit dem die Granula erzeugt worden sind und das sie vor dem Auswaschen reichlich adsorbirt hatten, wird von Neuem nicht so stark wieder adsorbirt, wenigstens nicht in allen Fällen. So gelingt es zwar, mit $PtCl_4$ gefällte Granula der Nucleinsäure durch $PtCl_4$ von neuem vollkommen achromatisch zu machen, es gelingt das aber nicht bei Platinalbumose, deren Tinctionsvermögen nur abgeschwächt wird.

Kapitel III. Färbung in einfachen Farblösungen ohne Differenzirung.

1. Primäre und secundäre Chromatophilie.

Die im vorigen Kapitel als indifferent bezeichneten Fixirungsmittel ändern das ursprüngliche, einem Eiweisskörper oder Gewebselement innewohnende Färbungsvermögen nicht und sind desshalb geeignet, die primäre Chromatophilie oder das primäre Adsorptionsvermögen ungetrübt hervortreten zu lassen. Mit solchen Fixirungsmitteln sind die ersten grundlegenden Versuche darüber anzustellen, ob gewisse Eiweisskörper wirklich basophil oder acidophil sind und sich entweder nur mit basischen oder nur mit sauren Farben in einfach wässrigen Lösungen färben. Die übrigen Fixirungsmittel verleihen dagegen neue chromatophile Eigenschaften, die als secundäre zu bezeichnen sind und auf das secundäre Adsorptionsvermögen zurückgehen. Ist das primäre stark und specifisch ausgeprägt, wie bei der vollkommen acidophoben Nucleinsäure, so verschiebt sich durch die Fixirung die Chromatophilie nicht und tritt immer rein primär zu Tage. Fehlt aber dem primären eine solche Intensität, so wird der Einfluss des Fixirungsmittels sehr bemerklich. Das secundäre Adsorptionsvermögen dominirt.

Als Vertreter der basischen Farben wurden bei allen folgenden Versuchen in 0,1-proc. wässriger Lösung benutzt: Fuchsin, Safranin, Methylgrün, Methylenblau und Gentianaviolett. Saure Farben wurden, um ihre geringere Färbkraft etwas günstiger zu stellen, in 0,5 Proc. verwendet und zwar: Säurefuchsin, Lichtgrün, Indulin, Pikrinsäure, Eosin und eine concentrirte wässrige Lösung von Methylorange. Gefärbt wurden die auf Deckgläser angetrockneten künstlichen Fällungen resp. die Paraffinschnitte 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur. Jede Differenzirung mit Alkohol und dergleichen wurde vermieden, um den vollen Färbungserfolg zu bewahren. Desshalb wurde nach kurzem Abspülen in Wasser getrocknet und sogleich in Balsam eingeschlossen.

Die Anilinfarben wurden in möglichster Reinheit von Dr. Grübler & Co. bezogen und nicht noch besonders gereinigt, um mit denselben Farben, die in den Händen aller Histologen sind, zu arbeiten. Auf Verunreinigungen hinweisende Metachromasien wurden nur beim Methylgrün beobachtet, weshalb dieses durch Amylalkohol von dem stets beigemengten Methylviolett befreit wurde. Man schüttelt am bequemsten in einer Titrirburette die Farblösung mit etwas Amylalkohol, der sehr bald, tief violett gefärbt, sich über der Methylgrünlösung ansammelt. Diese kann man nun ablaufen lassen und nochmals mit Amylalkohol schütteln. Ich habe mehrere, als möglichst rein bezeichnete Methylgrüne untersucht und stets Violett reichlich darin gefunden. Das Jodgrün, das noch oft als beliebter Farbstoff genannt wird, gibt es gar nicht mehr und alles, was unter diesem Namen noch verkauft wird, ist weiter nichts wie Methylgrün. Man sollte daher Jodgrün ganz aus der Liste der histologischen Farbstoffe streichen und dafür den richtigen Namen Methylgrün einsetzen, dabei stets sich erinnernd, dass jedes Methylgrün mit Violett verunreinigt ist und erst davon befreit werden muss,

wenn man das primäre Adsorptionsvermögen eines Eiweisskörpers bestimmen will. Man wird sofort auf eine sonderbare Eigenschaft des Methylgrünes stossen, die es von allen anderen basischen Farben unterscheidet. Um eine klare Uebersicht zu bekommen, ist es daher nothwendig, zunächst das gereinigte Methylgrün zu besprechen und dann die übrigen basischen und sauren Farben folgen zu lassen, deren Färbkraft an künstlichen und natürlichen Objecten sich leicht in Regeln einordnen lässt.

I. Methylgrün (mit Amylalkohol gereinigt).

Die scheinbar metachromatischen Färbungen mit dem rohen, käuflichen Methylgrün sollen in dem besonderen Abschnitt über Methylgrün-Fuchsin besprochen werden. Mit Amylalkohol gereinigtes Methylgrün (0,5-proc. in Wasser) färbt Nuclein und Nucleinsäure (aus Hefe und Thymus), die durch Chromsäure oder Platinchlorid gefällt sind, ausserordentlich intensiv, ohne dass eine besondere Adsorptionsstimmung, die von den Fixirungsmitteln herrühren könnte, hervortritt. Ebenso stark färbt sich Nuclein, wenn es indifferent mit Essigsäure gefällt worden war. Kurz, jene Stoffe, für die von jeher das Methylgrün als specifischer Farbstoff genannt worden ist, färben sich bei jeder Fällung gleich stark. Albumose, Serumalbumin, Globulin, Casein und Hämoglobin, mit Chromsäure oder Kaliumbichromat gefällt, nehmen, selbst nach bestem Auswaschen, keine Spur von Methylgrün auf. Dieselben Stoffe, mit Platinchlorid gefällt, überraschen durch ungleiches Verhalten. Sehr intensiv färbt sich jetzt die Albumose, wenn auch nicht ganz so tief, wie die Nucleinsäure, und annähernd ebenso stark auch das Amphopepton. Sehr blass dagegen bleibt das Hämoglobin. Stärker, wenn auch nicht optimal färben sich die Platinniederschläge von Albumin, Globulin und Casein. Sicher ist, dass alle diese Stoffe, die durch Chrom ganz unfähig zur Aufnahme des Methylgrünes werden, sich mehr oder weniger gut damit färben, wenn Platin ihnen einverleibt wird. Das vom Fixirungsmittel eingeimpfte secundäre Adsorptionsvermögen dominirt also hier, während Nuclein und Nucleinsäure davon nicht beeinflusst werden. Man wird schon aus diesen ersten Versuchen schliessen dürfen, dass das primäre Adsorptionsvermögen für Methylgrün bei den Nucleinkörpern ein viel stärkeres ist, als bei den anderen Eiweisskörpern. Um darüber Näheres zu erfahren, benutzen wir die Alkoholfällung von Albumin, Globulin, Casein und Hämoglobin, die Formaldehydfällung der Albumose. Diese letztere färbt sich zwar weniger stark als die Platinalbumose, aber doch recht gut, schätzungsweise über mittelstark. Albumin und Globulin nehmen vielleicht Spuren davon auf, sind aber der Einfachheit halber als unfärbbar zu bezeichnen. Nicht viel höher ist das Casein zu schätzen, das aber sicherlich, wenn auch schwach bis sehr schwach, sich färbt.

Das Sublimat steigert allgemein das Adsorptionsvermögen für das Methylgrün und erreicht nahezu das Platin. Die Quecksilberalbumose färbt sich etwas übermittelstark, die anderen Eiweisskörper ähnlich, aber doch deutlich schwächer als die entsprechende Platinfällung. Eine bessere Uebersicht gewährt folgende Tabelle, in der 0 keine, + + + sehr starke Färbung, + + und + dazwischenliegende Grade be-

zeichnen. Ergänzt ist die Tabelle noch durch einige Niederschläge mit Osmiumsäure, die, wie das Platinchlorid, eine positive secundäre Adsorption für Methylgrün verleiht.

Primäres und secundäres Adsorptionsvermögen für Methylgrün.

	Primär (Fällungsmittel in Klammern)	Secundär, gefällt mit			
		I. Chromsäure	II. Sublimat	III. Platinchlorid	IV. Osmiumsäure
1) Albumin	0 (Alkohol)	0	+	+ +	+ +
2) Globulin	0 (Alkohol)	0	+	+ +	+ +
3) Casein	+ (Alkohol)	0	+	+ +	
4) Hämoglobin	0 (Alkohol)	0	+	+	
5) Albumose	+ + (Formaldehyd)	0	+ +	+ +(+)	+ + (+)
6) Nucleinsäure	+ + + (Essigsäure)	+ + +		+ + +	
7) Nuclein	+ + + (Essigsäure)	+ + +		+ + +	

Das Gemisch Flemming's bessert infolge seines Osmiumgehaltes das Tinctionsvermögen deutlich auf, freilich wird theilweise wieder durch die Chromsäure gehemmt; gleichsinnig steigern Osmium und Platin in Hermann's Gemisch.

Nach der Tabelle haben zwar Nuclein und Nucleinsäure das *grösste primäre Adsorptionsvermögen* für Methylgrün, aber *die Albumose* (und Amphopepton) *steht ihnen nicht viel nach.* Daraus schon ergibt sich, dass die chemische Natur des Objectes die Färbung nicht so beeinflusst, wie die chemische Theorie der Färbung es voraussetzt, und dass auch der Phosphorgehalt nicht entscheidet. Hierüber vergleiche man das letzte Kapitel (dieses 2. Theiles) über die Grundlagen der Färbung.

Würde man keine anderen basischen Farben prüfen, so könnte doch leicht der Trugschluss sich aufdrängen, dass die als „acidophil" geltenden Albumine und Globuline sich mit dem Methylgrün desshalb gar nicht färben, weil es eine Farbbase ist. Freilich hätte man zufällig nur Alkohol und Chromsäure zur Fällung benutzen müssen, denn die schwereren Metalle (Quecksilber, Platin, Osmium) würden schon zu einer anderen Auffassung überführen, zu der, dass *Methylgrün keineswegs als Reagens auf Nucleinkörper* gelten kann, was auch durch die Tinction von Albumose und Amphopepton bestätigt wird. *Ebensowenig ist das Methylgrün ein Kernfarbstoff,* der aus der Reihe der basischen Farben, die ja alle als Kernfarbstoffe oft den sauren gegenübergestellt werden, *bedingungslos* als *besonders specifisch* hervorzuheben wäre. Denn alles, was das Methylgrün auszeichnet, ist, dass es *im Allgemeinen weniger stark färbt als die anderen basischen Farben* und *natürlich dort bereits ganz versagt, wo kräftigere, wie Safranin, Fuchsin, Methylenblau, Gentiana, noch stark färben.*

Denn alle diese färben die Alkoholfällung von Albumin, Globulin und Casein sehr intensiv, bei Hämoglobin tritt nur das Safranin etwas zurück. Ueber die secundäre Chromatophilie vergleiche man den übernächsten Abschnitt.

Wurzelspitzen von Vicia Faba, mit 4-proc. Formaldehyd indifferent fixirt, bestätigen, dass das Methylgrün kein Specificum für Kerne ist. Diese sind zwar, wie immer, stärker, aber keineswegs allein gefärbt, das Cytoplasma, besonders in der meristematischen Region der Wurzel, färbt sich auch sehr kräftig. Die Chromosomen haben oft nicht mehr Methylgrün angenommen als die Nucleolen der ruhenden Kerne. Noch stärker ist durchweg die Färbung nach Platinfixirung, ihr ähnlich, nur etwas schwächer nach Sublimat und nach Pikrinsäure. Nach FLEMMING'schem Gemisch ist eine stärkere, der Chromsäure zuzuschreibende Abneigung gegen Methylgrün bemerkbar, die aber auf alle Elemente sich erstreckt. Sicher werden in den Viciawurzeln Cytoplasma und Nucleolen vom Methylgrün gut gefärbt, die Kerne keineswegs specifisch bevorzugt.

Niere der Maus (Sublimat), Kerne sehr tief, Cytoplasma nur sehr blass gefärbt, rothe Blutkörperchen (vergl. später) ganz farblos.

Knochenmark des Kaninchens (Sublimat), Kerne sowohl in den Leucocyten, als auch in den Riesenzellen sehr stark, viel stärker als das Cytoplasma, dieses aber deutlich gefärbt, nur schwächer, als die anderen, oben genannten Farbbasen es färbten. Eosinophile Granulationen (vergl. später) und rothe Blutkörperchen bis zu den jüngsten farblos, nur einige der anscheinend allerjüngsten sind deutlich methylgrün.

Bakterien in milzbrandiger Niere (Maus, Sublimat) hatten sich mit Methylgrün, dem „Kernfarbstoff" sehr stark, ähnlich den Kernen gefärbt. Dagegen waren die Knöllchenbakterien der Lupine (Sublimat) blasser als das Cytoplasma und viel blasser als die stark gefärbten Kerne, sie verhielten sich also ganz anders als die Milzbrandbakterien bei gleicher Fixirung. Mit dem GRAM'schen Verfahren sind auch die Knöllchenbakterien gut darstellbar, jedoch viel leichter als die Milzbrandbacillen werden sie ganz entfärbt. Diese schnellere Entfärbung beruht auf denseben Eigenschaften wie die geringere Färbung mit Methylgrün, auf Substanzarmuth des Cytoplasmas. Die verschiedenen Bakterienarten und zweifellos sogar dieselbe Art in verschiedenen Ernährungs- und Alterszuständen haben ebensowenig durchweg ein stets gleichartiges Cytoplasma mit ganz constantem Färbungsvermögen wie jede beliebige andere Zelle, so dass, wie später noch ausführlicher zu besprechen ist, aus stärkerer Färbung mit Methylgrün keineswegs auf „Kernnatur" geschlossen werden darf. Deckglas-Trockenpräparate einer Reincultur des Bacillus fluorescens liquefac., der sich mit Safranin, Fuchsin, Methylenblau oder Gentiana sehr intensiv färbt, waren mit Methylgrün nur blass, ähnlich den Knöllchenbakterien gefärbt. Ebenso präparirte Milzbrandbacillen (15-stündige Reincultur) verhielten sich genau so, das Methylgrün hatte kaum einen blassen Hauch hinterlassen, alle anderen Farbbasen aber hatten intensiv gefärbt. Dieses Beispiel ist desshalb besonders zu beachten, weil es zeigt, dass der Milzbrandbacillus in dem Thierkörper (Maus) ein anderes Färbungsvermögen für Methylgrün erlangt als in den sicher weniger gut nährenden Reinculturen (Fleischwasser-Pepton-Zuckeragar).

Es bedürfen diese Fragen noch der weiteren Untersuchung, weil auch die Sporenbildung, die in der 15-stündigen Reincultur bereits weit vorgerückt war, soviel vom Cytoplasma occupirt haben konnte, dass die Färbung viel schwächer ausfallen musste als die der sporenfreien, wohlgenährten Bacillen in der Maus.

Sehr blass, aber deutlich methylgrün färbten sich noch folgende Bakterien: Staphylococcus aureus, Bacillus proteus, Sarcina lutea, etwas stärker, aber keineswegs optimal der Bacillus subtilis (sporenfrei). Selbst hier erreichte aber die Färbung keineswegs kernähnliche Tiefe und wurde von anderen Farbbasen, z. B. Fuchsin oder Gentiana, unvergleichlich übertroffen.

Steigerung der Färbkraft des Methylgrünes, dessen Sonderstellung unter den basischen Farben weiterer Aufklärung bedarf, konnte z. B. für die Granula aus Albumosechromat dadurch erreicht werden, dass diese mit wässriger Hefenucleinsäure imprägnirt wurden, worüber ich das Kapitel VI, 4. zu vergleichen bitte. Ganz allgemein und viel bequemer aber gelingt es, die Färbkraft des Methylgrünes bis zu der der übrigen basischen Farben zu steigern durch einen Zusatz von 2 ccm einer concentrirten wässrigen Boraxlösung auf 4 ccm 0,5-proc. gereinigtes Methylgrün. Auf dieses Hilfsmittel wurde ich durch die technische Färberei verwiesen, die (vergl. Knecht, Rawson und Löwenthal, I, p. 667) in gewissen Fällen ebenfalls Borax verwendet. Der Erfolg gegenüber unserem Object ist ein überraschender: Hämoglobin, mit Alkohol oder Kaliumbichromat gefällt, das der reinen Lösung gegenüber ganz widerspenstig ist, färbt sich in 10 Min. bei Zimmertemperatur in Borax-Methylgrün so intensiv, wie Nucleinsäure; keine Spur der früheren Abneigung ist geblieben. Ebenso wird das Albumosechromat, ferner die alkoholische Fällung von Casein, Albumin und Globulin, von letzterem auch das Chromat, so intensiv gefärbt, wie von allen anderen Farbbasen; selbst die zartesten Gerinnsel sind lebhaft gefärbt.

Pollenmutterzellen von Funkia (Sublimatfixirung), deren Cytoplasma nur sehr blass mit reinem Methylgrün sich färbt, während das Gerüst der ruhenden Kerne, die Knäuel und Chromosomen tief grün werden, bestätigen die Wirkung des Borax. Denn damit versetztes Methylgrün färbt das Cytoplasma ebenso intensiv wie die anderen Farbbasen und kaum geringer als die Chromosomen. Auch die achromatische Spindel wird nunmehr tief methylgrün.

Durch diese Versuche ist ein weiteres Verständniss angebahnt, sobald die Wirkung des Borax sich klarstellen lässt. Hierauf will ich nicht weiter eingehen, weil die sauren Farben an einem ähnlichen Beispiel von allgemeinerem Interesse uns zeigen werden, dass die mechanische Theorie der Färbung alles, soweit zunächst möglich, zu erklären vermag.

II. Primäres Adsorptionsvermögen gegenüber sauren und basischen Farben.

1) Pepton (Amphopepton) konnte nur als Platinverbindung, also mit secundärer Adsorptionsstimmung untersucht werden, weil alle indifferenten Fällungsmittel, wie Essigsäure oder Formaldehyd, gar nicht oder, wie Alkohol, wasserlöslich fällen. Das sonderbare Färbungsver-

mögen der Platinfällung wird erst in dem letzten Kapitel (Grundlagen der Färbung) besprochen werden.

2) Serumalbumin und Globulin, mit Alkohol gefällt, färben sich mit allen sauren Farben sehr intensiv, so stark, wie diese in rein wässriger Lösung überhaupt färben. Indulin und Nigrosin sind, wie stets, auch hier die verhältnissmässig schwächsten Farben, während Säurefuchsin, Lichtgrün, Eosin und Pikrinsäure sie weit übertreffen. Alle basischen Farben, ausser dem bereits besprochenen Methylgrün, färben das „acidophile“ Albumin und Globulin so stark, wie die Nucleinsäure. Basophobie ist auch nicht spurweise zu bemerken. Man beurtheile hier das Tinctionsvermögen nur nach den zartesten Gerinnseln oder den feinen Säumen der compacteren Massen, nicht nach den letzteren selbst, weil diese viel Farbstoff capillar festhalten und deshalb zum Vergleich nicht geeignet sind.

Durch Sublimat werden Albumin und Globulin nicht secundär beeinflusst, sauren und basischen Farben gegenüber verhalten sie sich wie nach Alkoholfällung, nur wird, wie schon bemerkt (p. 90), auch Methylgrün jetzt etwas aufgenommen. Das ist das einzige Anzeichen dafür, dass sich doch das Tinctionsvermögen etwas verschoben hat.

3) Deuteroalbumose (Formaldehyd oder Sublimat) färbt sich in sauren und basischen Farben gleich gut, in den ersteren immer etwas schwächer, weil diese in wässriger Lösung überhaupt nicht so farbkräftig sind wie die basischen. Beide Farbenarten werden, sobald sie an die Granula herangetreten sind, sogleich aufgenommen, ohne Färbungsverzögerung, ähnlich der des Nucleins gegenüber den sauren Farben. Die Albumose ist also primär indifferent, neigt weder zur Acido- noch zur Basophobie. Alle anderen basischen Farben geben tiefere Töne als das farbschwächere Methylgrün.

4) Casein (Alkoholfällung), das schon primär deutlich sich mit Methylgrün färbt, nimmt genau wie die bisher besprochenen Eiweisskörper alle anderen Farbbasen auf, bis zu tiefster Färbung, die noch die der Albumine und Globuline übertrifft. Aber auch die sauren Farben werden reichlicher gespeichert, eine mit dem Phosphorgehalt etwa zusammenhängende Acidophobie ist allgemein nicht zu bemerken. Denn dass nach Sublimatfällung Indulin und Pikrinsäure weniger gut färben als Säurefuchsin, Lichtgrün, Eosin und Methylorange, ist nur ein weiteres Beispiel für die allgemeine und stets hervortretende geringere Färbkraft dieser beiden Farbstoffe. Das Casein als Vertreter der Nucleoalbumine (Hammarsten) verhält sich also färberisch wie die Albumine und Globuline, nur gegenüber heterogenen Gemischen (Biondi's Gemisch) weicht es ab und nähert sich dem Nuclein.

5) Nuclein, indifferent mit Essigsäure gefällt, speichert alle basischen Farben sehr stark, aber färbt sich auch mit den sauren so intensiv, wie diese in wässriger Lösung überhaupt färben, selbst das Indulin färbt schön stahlblau. Dennoch entspricht dieser nach 10 Min. abgelesene Färbungserfolg nicht ganz der primären Chromatophilie des Nucleines. Die basischen Farben werden sofort aufgenommen, die sauren aber etwas langsamer, etwa in dem Verhältniss, dass das Methylgrün schon intensiv gefärbt hat, wenn das Säurefuchsin erst mit blassem Hauch beginnt. Innerhalb 10 Min. gleicht sich dieser

Unterschied bei indifferenter Fixirung wieder aus, er genügt aber, wie sich später zeigen wird, um eine Basophilie des Nucleines in heterogenen Gemischen hervorzurufen, besonders wenn noch durch ein geeignetes Fixirungsmittel ein gleichsinniges secundäres Adsorptionsvermögen hinzukommt.

6) Nucleinsäure (aus Hefe), mit Sublimat gefällt, nimmt keine einzige saure Farbe auf, nicht der leiseste Hauch davon ist zu verspüren; basische färben intensiv. Die Nucleinsäure ist der erste Fall einer vollkommenen primären Acidophobie, die so stark ist, dass sie auch durch Fixirungsmittel sich nicht beseitigen lässt. Man vergleiche das Pepton im Kapitel IX.

7) Serumalbumin, mit Nucleinsäure zu grob punktirten, in Wasser unlöslichen Gerinnseln gefällt, ein künstliches Nuclein, verhielt sich auch wie ein solches und färbte sich mit den basischen und sauren Farben gleich gut, die vollkommene Acidophobie der einen Componente war also durch die andere gelöscht und äussert sich nur noch bei Gemischfärbungen, z. B. mit Methylenblau-Säurefuchsin, indem die Gerinnsel rein blau werden, aus dem beim Nuclein bereits erwähnten Grunde. Man vergleiche hierzu ZACHARIAS (I, p. 191).

8) Hämoglobin und rothe Blutkörperchen. Die granuläre Alkoholfällung des Hämoglobines nimmt beide Farbengattungen gut auf; gegenüber den sauren besteht weder Eosino- noch Fuchsinophilie, denn ebenso intensiv färbt Lichtgrün, Methylorange und Pikrinsäure, nur das farbschwächere Indulin steht etwas zurück. Von den Farbbasen wurde Fuchsin, Methylenblau und Gentiana kräftig gespeichert, während Safranin etwas gehemmt war, Methylgrün aber ganz versagte (p. 90). Das Hämoglobin ist also primär keineswegs basophob, nur Methylgrün, das durch die Chromfixirung bei anderen Eiweisskörpern ebenfalls ganz ausgeschlossen wird, macht eine Ausnahme. Diese erklärt sich einerseits aus dem schon besprochenen Verhalten des Methylgrünes, andererseits aus dem Eisengehalt (0,3 bis 0,5 Proc.) des Hämoglobines. Um diese Frage zu erledigen, bedarf es aber noch einer genaueren Untersuchung über die Chromwirkung, was auf p. 100 nachgetragen werden soll.

Rothe Blutkörperchen (Blut aus der Fingerspitze, in 10-proc. Formaldehyd aufgefangen und auf Deckgläser angetrocknet) färben sich, genau wie das gefällte Hämoglobin, gar nicht mit Methylgrün, sehr intensiv mit allen anderen basischen Farben. Unter den sauren färbt Indulin am schwächsten, die Blutkörperchen sehen nur wie schmutzig überlaufen aus, die anderen färben maximal, nur Lichtgrün etwas weniger. Wenn das Blut aus der Fingerspitze in einem schweren Metallsalz aufgefangen und mit diesem auf Deckgläser angetrocknet wird, so wird man ohne vorheriges Abspülen nur dann richtige Färbungsresultate erhalten, wenn der Tropfen Metallsalzlösung gerade so gross war, dass kein Ueberschuss nach der Fällung übrigblieb. Das hängt vom Zufall ab. In 0,5 Sublimat fixirtes Blut hatte in einem Versuch sicher einen Ueberschuss an Sublimat, das nun hier ebenso färbungshemmend wirkte, wie in dem nicht ausgewaschenen Albumoseniederschlag auf p. 85: zwar eine starke Färbung mit den sauren Farben gestattete, die basischen aber alle sehr stark hemmte. Rothe Blutkörperchen in der Niere einer Maus (ebenfalls Sublimat) färbten sich sehr stark mit Eosin und Säurefuchsin und auch sehr schnell, während Indulin viel langsamer und auch Lichtgrün erst aufgenommen wird, wenn auch

die Zellkerne grün werden. Methylgrün färbt gar nicht, Safranin nur mittelstark, die andern basischen Farben kräftig, weil in diesen Nierenschnitten hemmende Ueberschüsse von Sublimat entfernt waren.

Die Eigenschaft des Hämoglobines Methylgrün zu verschmähen, Indulin viel langsamer als andere saure Farben, z. B. Eosin und Methylorange, aufzunehmen, zeichnet auch die rothen Blutkörperchen aus und erklärt vollkommen ihre Färbung in Biondi's Gemisch und in Ehrlich's triacider und eosinophiler Mischung (vergl. dort). Diese specifische Chromophobie gegenüber einzelnen Farbstoffen ist nach der chemischen Theorie der Färbung nur mit grossem Hypothesenapparat und nach dem üblichem Schema dieser Theorie überhaupt nicht zu erklären. Denn wenn das Hämoglobin mit gewissen basischen Farben sich färbt, also nach der chemischen Theorie freie Säureaffinität zur Farbsalzbildung besässe, dann müsste doch auch Methylgrün färben. Dasselbe würde für die sauren Farben zutreffen. Beruht aber die Färbung auf Adsorption, so ist sie die Resultante aus dem activen Adsorptionsvermögen des Hämoglobines und dem passiven der betreffenden Farben, woraus sich ohne Schwierigkeit specifische Färbungseigenschaften ableiten lassen.

9) Granulationen der Leucocyten bieten im Allgemeinen der mechanischen Theorie der Färbung keine Schwierigkeit, dagegen muss ich die Untersuchung der zahlreichen, von Ehrlich unterschiedenen Variationen den Medicinern überlassen. Nur das primäre Adsorptionsvermögen der eosinophilen Granulationen, die ja einen Fall strenger Basophobie darzustellen scheinen, musste ich, um vollständig zu sein, nachprüfen. In dem mit Formaldehyd oder Sublimat fixirten Blut färbten sich diese Granulationen in der That mit keiner basischen Farbe (0,1 Proc. in Wasser), aber auch die sauren färbten keineswegs so intensiv, wie sie Albumosechromat färben. Selbst das Eosin, das als Specificum für sie gilt, hatte oft nicht stark gefärbt, so dass man sogar im Zweifel sein konnte, ob hier erst die dichte Häufung schwach gefärbter Einzelgranula das intensivere Gesammtbild schuf. Aehnlich verhielt sich Säurefuchsin, Lichtgrün. Indulin hatte nur wenig gefärbt, Pikrinsäure so gut wie gar nicht. Ich halte daher eine nach den hier entwickelten Grundsätzen vorgehende Neuuntersuchung dieser eosinophilen Granulationen für sehr nothwendig.

Auch im Knochenmark des Kaninchens (Sublimat) verhielten sie sich so, soweit die intensive Färbung des Kernes und Cytoplasmas mit den basischen Farben einen sicheren Einblick gestattete. Oft sah man deutlich die ungefärbten Granulationen durchschimmern. Da aber vielleicht nur die dünnen, 0,1-proc. Lösungen gehemmt wurden, so musste noch aufdringlicher geprüft werden. Zunächst wurde festgestellt, dass in Eisenalaunhämatoxylin die Granulationen noch tief schwarz sind, wenn das Cytoplasma bereits ganz entfärbt ist. Die eosinophilen Granulationen der Leucocyten entfärben sich nicht schneller als Heidenhain's sog. Centrosomen in den Riesenzellen. Bei Gram'scher Färbung sind die Granulationen noch tief violett, wenn bis auf die Kerne entfärbt wird. Ebenso färbt Ziehl's Carbolfuchsin die eosinophilen Granulationen so intensiv, dass sie mit 5-proc. Schwefelsäure neben den Zellkernen sich gefärbt herausdifferenziren lassen. Es fehlt also den eosinophilen Granulationen keineswegs das Färbungsvermögen für ba-

sische Farben, nur sind diese durch irgend welche Umstände etwas zurückgedrängt und müssen desshalb in stärkeren Dosen einwirken. Eine strengere Basophobie, vergleichbar der Acidophobie der Nucleinsäure, die ja auch durch starke Lösungen nicht zu überwinden ist (p. 101), besitzen demnach die eosinophilen Granulationen nicht.

Auch der von Cuénot (I, p. 274) beschriebene Fall (Blut von Decapoden) wird sich so erklären, denn Cuénot benutzte sehr verdünnte Lösungen und färbte nur einige Secunden. Worauf die starke Hemmung der basischen Farben beruhen könnte, ist ohne besondere Untersuchung nicht zu sagen. Bemerkenswerth ist aber, dass die Granulationen gewissermaassen ein gesteigertes Adsorptionsvermögen des Hämoglobines besitzen. In der That sind ja von einigen Forschern die eosinophilen Granulationen als Hämoglobinkügelchen gedeutet worden (vergl. hierzu Ehrlich, II, p. 9 Anmerk., p. 92), was Ehrlich und seine Mitarbeiter allerdings nicht anerkennen wollen. Hierüber zu entscheiden, bedarf es neuer Untersuchungen, die jedenfalls auch bestätigen werden, dass die Granulationen keineswegs den Namen acidophil verdienen. Ebenso wie an den Blutpräparaten liess sich am Knochenmark (Sublimatfixirung) feststellen, dass die sauren Farben, sobald die Granulationen gelblich zu werden beginnen, ebensowenig aufgenommen werden wie die basischen, und dass eine ganze Stufenleiter von gut sich färbenden bis zu diesen nicht mehr sich färbenden besteht. Nach der wohlgelungenen Färbung mit Ehrlich's Triacidlösung sah man deutlich, dass in vielen Leucocyten, deren Granula durch anscheinend tiefe Rothfärbung sich vom grünen Kern abhoben, nur die Oberfläche der Granula gefärbt war. In anderen Leucocyten waren sie schwach durchgefärbt, in anderen endlich sahen sie intensiv roth aus. Dasselbe Resultat ergab Ehrlich's eosinophiles Gemisch, ferner Färbungen mit einfachen, 0,5-proc. Lösungen von Eosin, Säurefuchsin, Lichtgrün, Indulin und Pikrinsäure. Man erhält die Ueberzeugung, dass in die Granulationen irgend etwas eingelagert oder chemisch angehäuft wird, was nicht bloss die Färbung mit basischen Farben, sondern auch mit sauren zunächst beeinträchtigt und schliesslich ganz verhindert. Zuerst versagen die basischen Farben, später die sauren und unter ihnen zuletzt Eosin, Säurefuchsin und Methylorange und hierauf beruht die Eosinophilie oder Acidophilie dieser Granulationen. Man vergleiche hiermit die p. 85 geschilderte Färbung von nicht ausgewaschenem Albumosechromat. Das Chrom, dessen naher Verwandtschaft mit dem Eisen wir uns hier zu erinnern haben, drängt alle Farben zurück, ausgenommen Säurefuchsin, Eosin und Orange (No. 1, 3, 8 u. 9 der Tabelle auf p. 85). Die „acidophilen" Granulationen sind also nicht basophob, sie sind nicht einmal acidophil, sondern nur durch ein, bald stärker, bald schwächer wirkendes, specifisches Adsorptionsvermögen ausgezeichnet.

10) Bacterien, Trockenpräparate aus jungen Reinculturen, des Bacillus anthracis und des Bacillus fluorescens liquefaciens. Methylgrün (p. 92) färbt je nach dem Substanzreichthum des Cytoplasmas bald sehr schwach, bald stärker, während die farbkräftigen, wie Fuchsin, Methylenblau, Gentiana, intensiv färben, Safranin aber unter mittlerer Stärke. Indulin und Pikrinsäure versagten gänzlich. Eosin hatte den Milzbrandbacillus gut blassrosa, den Fluorescens merklich schwächer gefärbt. Lichtgrün und Säurefuchsin gaben mittel-

starke Färbung, die beim Fluorescens sicher die des Methylgrünes übertraf.

Eine allgemeine Regel, dass alle basische Farben alle angetrockneten Bacterien stärker färben als alle sauren, würde also nicht zutreffen, wenngleich nicht zu verkennen ist, dass es oft sich so verhält. Jedoch verlangt ein solcher Augenschein noch mehrere Correcturen, die sich aus Späterem von selbst ergeben werden.

Mit Sublimat fixirte Bacillen in der Niere einer Milzbrandmaus (vergl. No. 12) färbten sich mit Lichtgrün, Säurefuchsin, Eosin ebenso intensiv wie das Cytoplasma der Nierenzellen. Ueber ihre Färbung mit Methylgrün vergl. man p. 92.

11) Pollenmutterzellen von Funkia ovata (Alkoholfixirung). Ausser dem bereits p. 93 besprochenen Methylgrün färben alle basischen Farben alle Zellelemente äusserst intensiv, weder das Cytoplasma noch die Nucleolen treten hinter den ruhenden Kernen und Chromosomen zurück, die nur infolge ihres grösseren Substanzreichthumes etwas tiefer sich färben. Ebensowenig wie das Cytoplasma basophob ist, ebensowenig sind die Chromosomen acidophob, denn sie färben sich mit allen sauren Farben ebenso intensiv wie mit den basischen; ebenso nehmen die Nucleolen, das Cytoplasma und das Gerüst der ruhenden Kerne die sauren Farben innerhalb 10 Minuten bis zu maximaler Färbung auf. Auch die achromatischen Fäden der karyokinetischen Figur sind stets intensiv gefärbt. Würde man die Wirkung der sauren Farben unter dem Mikroskop verfolgen, so würde sich gegenüber den basischen Farben derselbe Unterschied herausstellen, der beim nächsten Object besprochen werden wird.

12) Niere der Maus (an Milzbrand verendet), mit Sublimat fixirt. Alle sauren Farben färben schon bei Zimmertemperatur und in rein wässriger, 0,5-proc. Lösung alles intensiv, auch die Zellkerne, die Färbung ist ebenso optimal wie mit basischen Farben. Verfolgt man aber die Färbung unter dem Mikroskop, indem man zu den bereits eingestellten, noch ungefärbten Präparaten den Farbstoff zufliessen lässt, so wird man einen Unterschied wahrnehmen, der auch bei den anderen Objecten sich feststellen lässt. Die durch den Schnitt diosmirenden sauren Farben färben zunächst nur das Cytoplasma und erst, um wenige Zeit, einige Secunden später auch die Kerne, die schliesslich ebenso lebhaft gefärbt sind, wie das Uebrige. Dagegen färben die basischen Farben Kerne und Cytoplasma ungefähr gleichzeitig und die ersteren sogleich etwas stärker als das letztere. Es besteht also eine leichte, in wenigen Secunden überwindbare „Abneigung" der Kerne gegen saure Farben, und hierauf, nicht auf der „Zuneigung" zu den basischen beruhen die schönen Doppelfärbungen in heterogenen Gemischen, z. B. Biondi's oder Ehrlich's Triacid. Hierüber wird im übernächsten Absatz genau zu sprechen sein.

13) Hoden eines Hingerichteten[1]), in Sublimat oder Pikrinsäure fixirt. Die Kerne der Spermacyten befanden sich fast durchweg im Knäuelstadium, vereinzelte andere Mitosen waren eingestreut. Die dicken, substanzreichen Chromatinmassen der Knäuel färben sich mit sauren Farben ebenso lebhaft wie das Cytoplasma und die ruhenden

---

1) Das sogleich nach der Enthauptung fixirte Material verdanke ich meinem Collegen Professor Hans Held.

Kerne, das Chromatin ist auch hier nicht acidophob. Ebenso fehlt auch jede Andeutung, dass basische Farben von irgend welchen Theilen der Zellen verschmäht würden, der gesammte Inhalt ist gleichmässig stark gefärbt.

14) Resultat. Die untersuchten Eiweisskörper zerfallen nach ihrer bei indifferenter Fällung (Alkohol, Formaldehyd, Essigsäure) rein hervortretenden primären Chromotophilie in zwei Gruppen: acidophobe und indifferente. Zu den ersteren, denen keine Gruppe der basophoben gegenübersteht, gehört die Nucleinsäure und das später (Kap. VII, 6) noch zu besprechende Pepton. Unter den indifferenten lassen sich noch Untergruppen unterscheiden. Die eine mit schwacher Acidophobie schliesst durch das Nuclein an die Nucleïnsäure an, die Acidophobie wird aber schon in wenigen Secunden überwunden und kann nur in heterogenen Farbgemischen (Biondi's Gemisch, Säurefuchsin-Methylenblau etc.) als „Basophilie" hervortreten. Eine ganz indifferente Gruppe vertritt die Albumose, von der nur in zahlreichen Nuancen Albumine, Globuline, Casein und Hämoglobin abweichen durch ihr besonderes Verhalten gegen Methylgrün, dem sich unter den basischen Farben zunächst Safranin (Hämoglobin), unter den sauren das Indulin anschliesst. Sicher ist keiner der genannten Eiweisskörper streng basophob.

In den indifferent oder durch Sublimat nahezu indifferent fixirten Objecten ist kein einziger Zellbestandtheil total acidophob, auch die Chromosomen der Pollenmutterzellen und die Chromatinknäuel des Hodens nicht. Freie, acidophobe Nucleinsäure kann also das „Chromatin" schon aus diesem Grunde nicht sein, ganz abgesehen davon, dass die Chromosomen auch durch solche Fixirungsmittel unlöslich conservirt werden, welche die Nucleinsäure gar nicht oder nur wasserlöslich fällen (Alkohol, Osmiumsäure etc.). Dagegen stimmt das Verhalten der Chromosomen und auch das des ruhenden Kernes mit dem des Nucleines überein, eine schwache, leicht überwindbare Abneigung gegen saure Farben ist vorhanden. Dem Cytoplasma aber und den Nucleolen fehlt jede Abneigung gegen basische Farben, nur das Methylgrün tritt zuweilen, aber keineswegs immer und oft in verschiedenem Grade etwas zurück. Die „Acidophilie" des Cytoplasmas und der Nucleolen in heterogenen Gemischen beruht daher auf ganz anderen Ursachen, als die „Basophilie" der Nucleinsäure und des Nucleines. Diese letztere ist die Folge einer mehr oder weniger grossen Acidophobie, während die saure Färbung von Nucleolen und Cytoplasma einfach darauf beruht, dass in heterogenen Gemischen der saure Antheil stets zuerst herandiffundirt und alles, was ihm nicht widersteht, sofort färbt.

Dass in den natürlichen Objecten die einzelnen Elemente in sehr verschiedenem Grade die Farben speichern, ist nicht auffällig und mechanisch leicht verständlich. Auch die Granulationen der Leucocyten wiedersprechen nicht der Erfahrung, dass bisher kein Stoff mit totaler Basophobie, die der totalen Acidophobie der Nucleinsäure äquivalent zu setzen wäre, gefunden worden ist. An dieser Stelle wird das spätere Kapitel über die Grundlagen der Färbung die theoretische Betrachtung anzuknüpfen haben.

III. Secundäres Adsorptionsvermögen gegenüber sauren und basischen Farben.

Durch Einführung schwerer Metalle in das Molekel der Eiweisskörper wird, wie schon erwähnt, ihnen vielfach eine neue, secundäre Chromatophilie aufgeprägt. Dass Stoffe, wie Alkohol, Essigsäure, Formaldehyd, in dieser Beziehung indifferent sind, kann ja nicht verwundern, da sie ja nur physikalisch fällen. Aber auch die Pikrinsäure, die doch sicher chemisch wirkt, verschiebt die primäre Chromatophilie nicht; selbst das empfindliche Methylgrün (Wurzelspitzen von Vicia Faba) wurde kaum gestört. Auch alle sauren Farben gaben nach Pikrinsäurefixirung (Wurzelspitzen, menschlicher Hoden) intensive Färbung des Cytoplasmas, der Nucleolen und des Chromatines.

Allgemein ist als Regel aufzustellen, dass nur die schweren Metalle secundäre Färbungsstimmung verleihen, dass diese nur gegen die sauren Farben und das Methylgrün sich richtet und in gesetzmässigen Beziehungen zum specifischen Gewicht steht.

1) Chrom (spec. Gew. 6,8) hält das Methylgrün ganz ab, sobald der betreffende Eiweisskörper auch bei indifferenter Fällung schwach oder nur mittelstark sich färbt, also beim Casein und bei der Albumose; eine deutliche Schwächung des Safranines war bemerkbar bei der Chromfällung der Albumose, des Albumines, des Caseines. Besteht, wie bei Hämoglobin, bereits primär eine totale Abneigung gegen Methylgrün, so ändert sich das durch Chromirung natürlich nicht. Im Uebrigen verschiebt das Chrom die primäre Chromatophilie nicht: Albumosechromat färbt sich mit den sauren Farben und den anderen basischen (Fuchsin, Gentiana, Methylenblau) ungefähr ebenso intensiv wie nach Fällung mit Formaldehyd. Bestätigt wird dies durch Versuche mit Albumin, Casein, Hämoglobin. Ist aber, wie bei Nuclein und Nucleinsäure, das primäre Adsorptionsvermögen für Methylgrün sehr gross, so färbt dieses auch die Chromfällung ungeschwächt. Dass aber das Chrom keine secundäre Stimmung für saure Farben verleiht, geht daraus hervor, dass die Chromfällung der Nucleinsäure vollkommen acidophob ist und die des Nucleines mit sauren Farben nicht schneller sich färbt, als die Fällung mit Essigsäure.

2) Eisen (spec. Gew. 7,84), dem vorigen chemisch nahestehend, wirkt, soweit versucht wurde, ebenso. Deuteroalbumose (10-proc.) mit Eisenchlorid in grob punktirten Gerinnseln gefällt, färbte sich mit Methylgrün gar nicht, aber sehr intensiv mit allen anderen basischen und sauren Farben. Granula aus Platinalbumose, die 20 Stunden in 1,5-proc. Eisenalaun gelegen hatten, färbten sich ungeschwächt mit Fuchsin und Methylenblau, gar nicht mit Methylgrün, mit sauren Farben (Säurefuchsin, Lichtgrün, Eosin) ungefähr so stark, wie die nicht imprägnirte Platinalbumose überhaupt. Vergleicht man diese wenigen Versuche mit dem primären Adsorptionsvermögen des Hämoglobines und mit der oben besprochenen Wirkung des Chromes, so ist die Uebereinstimmung doch sehr auffällig. Die Vermuthung, dass das Eisen des Hämoglobines dessen specifische Chromatophilie bestimmt, ist nicht von der Hand zu weisen.

3) Quecksilber (spec. Gew. 13,6) fördert allgemein die Färbung mit Methylgrün und bringt es sogar dahin, dass auch

Hämoglobin sich färbt. Ja man ist bei Vergleichen stets im Zweifel, ob das Quecksilber allgemein die Adsorption für die basischen Farben hebt oder nur desshalb zu heben scheint, weil es die Adsorption für die sauren Farben etwas vermindert. In einem Versuch mit Albumin war es zweifellos, dass die Chromfällung viel stärker mit den sauren Farben sich gefärbt hatte, als die Sublimatfällung, während die basischen Farben, abgesehen von Methylgrün, nicht beeinflusst zu sein schienen. Das Quecksilber scheint in der That auf der Grenze zu stehen und zu den Metallen überzuleiten, die eine sehr scharfe secundäre Adsorption verleihen.

4) Platin (spec. Gew. 21,5) und Osmium (21,4) wirken gleichsinnig dahin, dass alle sauren Farben mehr oder weniger geschwächt, die basischen zweifellos gesteigert werden. Das letztere tritt am deutlichsten am Methylgrün hervor, dass alle Platin- und Osmiumfällungen von Albumose, Albumin und Globulin stark, falls wie bei Albumose Granula vorliegen, sogar sehr stark färbt. Die Platinfällung des Hämoglobines ist hier besonders beachtenswerth. Methylgrün färbt recht hübsch, und alle anderen basischen Farben sind im Vergleich zum Alkoholniederschlag deutlich gesteigert, die sauren auffallend vermindert.

Die Platinalbumose verhielt sich genauer folgendermaassen. Sie färbt sich mit allen basischen, auch mit Methylgrün in 10 Minuten optimal, die grossen Granula erscheinen infolge ihrer grösseren Masse stets tiefer gefärbt als die kleineren. Von den sauren färbt am schwächsten Indulin, dann folgt Pikrinsäure, stärker wirken Lichtgrün und Säurefuchsin, am besten Eosin. Die grossen Granula, die von den Farbbasen tief gefärbt werden, nehmen von den sauren (0,5-proc.) meist nur wenig auf und sind nicht selten ungefärbt. Durch höhere Concentration (2-proc.) lässt sich diese secundäre Acidophobie der Platinalbumose für Säurefuchsin und Eosin anscheinend ganz überwinden, nicht so gut für die anderen. Und doch nur scheinbar, denn wenn man durch Schwefelsäure, resp. für Eosin mit Alaun die Färbkraft zum Optimum steigert, so ist noch eine viel lebhaftere Färbung zu erzielen. Von der total acidophoben Nucleinsäure unterscheidet sich aber die Platinalbumose fundamental dadurch, dass ihre secundäre Abneigung durch stärkere Lösungen oder schon durch kurzes Erwärmen oder durch Verlängerung der Färbzeit wesentlich vermindert werden kann.

Fast noch stärker als Platin wirkt Osmium. Frisch gefällte und gut ausgewachsene Osmiumalbumose speicherte alle Farbbasen sehr intensiv, dagegen hinterliessen Indulin, Pikrinsäure, Methylorange nur einen eben erkennbaren Hauch, Eosin färbte sehr schwach, nur Säurefuchsin und Lichtgrün wirkten etwas kräftiger, aber doch weit unter dem mit wässrigen Lösungen erreichbaren Maximum. Hier wurde auch durch 10 Min. langes Erwärmen nur wenig gebessert. Osmiumfällungen von Albumin und Globulin färbten sich mit Safranin oder Methylgrün sehr lebhaft, schwach bis sehr schwach in Säurefuchsin und Lichtgrün. Also es herrschte die gleiche Stimmung wie bei der Osmiumalbumose.

Die Platinfällung der Nucleinsäure (Thymusnucleinsäure) ist selbstverständlich vollkommen acidophob, färbt sich selbst dann nicht, wenn sie in 2-proc. Lösungen von Lichtgrün oder Säurefuchsin eine Stunde lang auf dem kochenden Wasserbade

erhitzt und noch 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen wird. Tiefere Temperaturen, 0 bis + 5° 20 Stunden, waren auch ohne Erfolg. Und doch lässt sich diese anscheinend unüberwindliche Acidophobie leicht unterdrücken, einmal durch Imprägnation mit Albumoselösung (vergl. später) und zweitens durch Zusätze zu den Farblösungen (vergl. p. 103).

5) Fixirungsgemische. Ebenso wie jede Componente specifische Fällungskraft hat und sie auch unabhängig äussert, ebenso verleiht auch jede Componente die ihr eigene specifische Adsorption. Man beachte z. B., dass die Osmiumsäure in FLEMMING's Gemisch gerade entgegengesetzt wirkt wie die Chromsäure, während sie in HERMANN's Gemisch gleichsinnig mit dem Platin die primäre Chromatophilie umstimmt. Deshalb ist z. B. die mit HERMANN's Lösung gefällte Albumose sehr stark acidophob, während die mit FLEMMING's Lösung gefällte sich z. B. mit Eosin, Säurefuchsin, Lichtgrün gut färbt. Der procentische Gehalt solcher antagonistischer Stoffe, wie Chromsäure und Osmiumsäure, entscheidet in jedem einzelnen Falle das Färbungsvermögen.

6) Auch den natürlichen Objecten wird durch die eben besprochenen Fixirungsmittel eine secundäre Adsorption aufgeprägt und nicht bloss einzelnen Theilen der Zelle, sondern allen. Ein Beispiel wird genügen. In Wurzelspitzen von Vicia Faba, die mit 1 Proz. Platinchlorid fixirt waren, nahmen die Chromosomen nur das Eosin etwas kräftiger an, etwa ebenso wie die ruhenden Kerne und das Cytoplasma. Dagegen hatten Säurefuchsin, Lichtgrün, Indulin und Pikrinsäure die Chromosomen eben nur angehaucht, ihre Färbung war oft gleich Null. Am intensivsten hatten sich die Nucleolen mit ihnen gefärbt, während das Gerüst der ruhenden Kerne viel blasser war, ähnlich wie das Cytoplasma. Gegenüber basischen Farben aber war die nach Sublimatfixirung charakteristische primäre Adsorption (vgl. p. 98) nicht geschwächt. Es tritt also auch hier die secundäre Acidophobie durch Platin klar hervor. Wurzelspitzen, mit FLEMMING's Gemisch fixirt, färbten sich mit sauren und basischen Farben annähernd gleich schwach, die durch das Chrom nicht verschobene Adsorption der sauren war durch das acidophobe Osmium herabgedrückt und umgekehrt dessen Stimmung für die Farbbasen, wenigstens partiell für Methylgrün, z. B. durch die Chromsäure gelähmt.

7) Allgemeines. Ebensowenig wie die primäre spricht sich auch die secundäre Chromatophilie darin aus, dass aus einfachen Farblösungen entweder nur rothe oder nur blaue und grüne Farben aufgenommen werden, eine Cyanophilie und Erythrophilie oder richtiger Erythrophobie und Cyanophobie, die etwa der Acidophobie der Nucleinsäure zu vergleichen wären, gibt es nicht: weder unter den Eiweiss- und Nucleinkörpern, die man aus den natürlichen Objecten isolirt hat, noch in diesen selbst. Daher müssen die Ursachen der cyanophilen und erythrophilen Färbung aus Farbgemischen anderer Natur sein, was sich später auch zeigen wird.

Abgesehen von der primär acidophoben Nucleinsäure, deren sonderbare Eigenschaft einstweilen als gegeben zu betrachten ist, würden der chemischen Theorie der Färbung nur noch die secundären Chromatophilien, hervorgerufen durch die schweren Metalle Chrom, Platin, Osmium, eine Stütze zu bieten scheinen. Denn wenn die Platin- oder Osmiumalbumose mit sauren Farben sich sehr schwer, die Chrom-

albumose aber sehr leicht färbt, so beruht doch dieser Unterschied sicher auf der chemischen Natur dieser Verbindungen. Zunächst ist aber zu bedenken, dass die Chromsäure das primäre Adsorptionsvermögen für saure Farben gar nicht ändert, denn das indifferente Formaldehyd oder das Sublimat fällt Niederschläge, die sich ebenso stark färben. Das Specifische des Chromes liegt nur in der Wirkung auf Safranin, besonders Methylgrün, denen sich wahrscheinlich noch andere Farbbasen anschliessen werden. Eine allgemeine Abstumpfung gegen diese ganze Gruppe verleiht aber das Chrom nicht. Es bliebe also wiederum nur die allgemeine, aber einseitige Wirkung des Platines und Osmiums gegen die sauren Farben übrig, die auch hier wieder als Gruppe hinter den basischen zurückstehen. Wenn nun wirklich die Färbung eine echt chemische Salzbildung wäre, so würde das Platin und Osmium also gewissermaassen diejenigen basischen Affinitäten der Albumose z. B. binden, die ursprünglich für die Farbsäure frei waren. Das indifferente Sublimat aber, ein Chlorid wie das Platinchlorid, könnte nicht so wirken, obgleich es doch zweifellos bei der Fällung sich in derselben Weise mit den Eiweisskörpern verbindet wie das Platin. Da andererseits die Chloride des Platines und Quecksilbers nach p. 86 alle sauren Farben nicht fällen (nur Eosin macht eine Ausnahme), so fehlt jeder Grund zu der Annahme, dass chemische Beziehungen zwischen Farbstoff und Fixirungsmittel die secundäre Chromatophilie bestimmen. Selbst wenn man sich darauf berufen wollte, dass das Sublimat nicht adsorbirt wird, wohl aber das Platinchlorid, und, dass dieses deshalb so ausgesprochen wirke, so widerspricht dem die Osmiumsäure, die (p. 86) keinen einzigen Farbstoff fällt.

Aus allen diesen Widersprüchen erlöst die physikalische Theorie der Färbung. Dass das Adsorptionsvermögen eines Stoffes, wie jede andere physikalische Eigenschaft, von seiner chemischen Natur abhängt, unterliegt ja keinem Zweifel, und hieraus erklärt sich vollkommen die ungleiche secundäre Adsorption nach Chrom oder Platin. Ja, die vollkommen gleiche secundäre Adsorption, die Platin und Osmium verleihen, folgt von selbst aus der chemischen Aehnlichkeit dieser beiden Elemente der Platingruppe. Ebenso wurde schon auf die gleichsinige Wirkung des Chroms als Fixirungsmittels und des Eisens im Hämoglobin hingewiesen.

Ich zweifle nicht, dass auch andere verwandte Metalle gleichsinnig wirken werden, wie in den bisher aufgedeckten Fällen. Diese schon werden genügen, um zu zeigen, wie die physikalische Theorie der Färbung ohne Anstoss die secundäre Chromatophilie unter allgemeine Gesichtspunkte bringen kann. Es wird aber noch neuer Thatsachen bedürfen, um auch das primäre Adsorptionsvermögen besser zu verstehen.

Unzugänglich für die chemische Theorie ist auch noch die Erscheinung, dass die secundäre Chromatophilie alle Theile einer Zelle gleichsinnig trifft, z. B. dass Platin nicht allein die Chromosomen, sondern auch die Nucleolen und das Cytoplasma gegen saure Farben herabstimmt, für basische hebt, dass überall die typische Wirkung des Platines, gleichviel ob es mit Nuclein oder Albumin oder Hämoglobin oder Albumose verbunden ist, dominirt.

2. Steigerung der Färbkraft saurer Farben.

Die technische Färberei (Hummel-Knecht, I, p. 269, 271) verwendet die sulfosauren Farben, wie Lichtgrün und Säurefuchsin, nur

in stark schwefelsaurem Bade, dem ausserdem, wenn die Färbung unregelmässig verläuft, noch ca. 20 Proc. schwefelsaures Natron zugesetzt werden. Nach HUMMEL-KNECHT (I, p. 271) hat das Säurefuchsin überhaupt nur die halbe Färbkraft des Fuchsins und bedarf eines Zusatzes von 2—4 Proc. Schwefelsäure; ähnlich das Lichtgrün. Die Induline vertragen einen so starken Säurezusatz nicht. Hier wird (HUMMEL-KNECHT, I, p. 280) die Farblösung auf 100° erhitzt und dann erst in kleinen Mengen von Zeit zu Zeit die Schwefelsäure zugesetzt. Pikrinsäure verlangt, um Wolle oder Seide gut zu färben, ebenfalls 2—4 Proc. Schwefelsäure von 66° BEAUMÉ. Endlich wird Eosin (0,5—2-proc.) für thierische Wolle mit 5—10 Proc. Alaun versetzt, um maximal zu färben (HUMMEL-KNECHT, I, p. 295). Die basischen Farbstoffe, das mag besonders noch hervorgehoben werden, verwendet die Technik auf Wolle vorwiegend in neutralem Bade, weil sie hier schon ihre maximale Färbkraft entfalten.

Nach diesen Grundsätzen gelang es auch, die vollkommene Acidophobie der Nucleinsäure zu beseitigen und sie mit allen sauren Farben ebenso intensiv zu färben, wie mit den basischen. Leichter war die geringere, secundäre Acidophobie der Platin- und Osmiumalbumose zu überwinden. Ebenso diejenige der Chromosomen in Wurzeln, der Kernknäuel im Hoden.

1) Osmiumalbumose färbte sich in 10 Minuten schon bei Zimmertemperatur äusserst intensiv, wenn zu 10 ccm einer 0,5-proc. Lösung von Säurefuchsin, Lichtgrün oder Indulin 15—20 Tropfen 5-proc. Schwefelsäure (d. h. käufliche concentrirte auf $^1/_{20}$ verdünnt) in gleichen Intervallen zugesetzt wurden. Pikrinsäure wurde in derselben Weise bedeutend aufgebessert. Eosin endlich erhielt auf 8 ccm einen Zusatz von 1 ccm 1-proc. Alaun, wodurch ein dicker, lebhaft orangerother Brei ausgefällt wurde, in dem sich die Osmiumalbumose optimal färbte. Mit gleichem Erfolg gelang es, schon bei 12 Tropfen 5-proc. H_2SO_4 die Albumosegranula, die mit HERMANN's Gemisch gefällt waren, intensiv zu färben. Eosin wurde wie oben angewendet, gleich stark mit Alaun wurde auch Methylorange versetzt und färbte nunmehr intensiv.

2) Nucleinsäure. Die ersten Versuche wurden mit der Platinfällung der Thymusnucleinsäure angestellt, grossen, in Wasser ganz unlöslichen Granulis, die selbst einstündiges Erhitzen auf dem Wasserbad. ohne sich zu lösen, vertrugen. Da es zuerst wünschenswerth war, die Recepte der Technik möglichst einzuhalten, so wurde sehr viel concentrirte Schwefelsäure zugesetzt, sicher viel zu viel, wie spätere Erfahrungen an der Hefennucleinsäure lehrten. Ob die Thymusnucleinsäure auch mit schwächerer Säuerung zu bezwingen ist, konnte später nicht mehr festgestellt werden, ist aber sicher anzunehmen. Eosin wurde in dem gleichen Alaunzusatz verwendet wie bei No. 1 und färbte äussert intensiv. Zu 8 ccm einer 1-proc. Säurefuchsinlösung musste 1 ccm concentrirte Schwefelsäure gesetzt werden, um eine intensive Färbung zu erzielen, die Granula waren nunmehr ebenso leuchtend roth gefärbt wie in Safranin oder Fuchsin. Nur stellten sich zuweilen kleine Unregelmässigkeiten ein, einzelne Granula in dem sonst schön gefärbten Präparat hatten versagt. Die Technik egalisirt solche Schwankungen durch 20-proc. schwefelsaures Natron, was auch die Nucleinsäure schön aufbesserte. Grösserer oder geringerer Zusatz

von Schwefelsäure verschlechtert die Färbung, die sicherlich viel bequemer in vollster Intensität und Gleichmässigkeit sich hätte erzielen lassen, wenn man wie bei 1 verdünnte Schwefelsäure langsam zugetropft hätte. So gelang es z. B., die Platinfällung der Hefenucleinsäure schon recht gut mittelstark zu färben, wenn zu 10 ccm 1-proc. Säurefuchsin 12 Tropfen 5-proc. H_2SO_4 in 10 Min. zugetropft wurden. Die Chromsäurefällung dieser Nucleinsänre war leider in stärkerer Schwefelsäure nicht ganz unlöslich, so dass, als 10 Tropfen concentrirte Schwefelsäure minutenweise zugesetzt und dadurch die intensivste Färbung erreicht worden war, der granulär-knorrige Niederschlag etwas gelitten hatte.

Lichtgrün verhält sich wie das Säurefuchsin und gibt ebenfalls die schönsten Färbungen, wenn die Schwefelsäure nicht auf einmal, sondern tropfenweise zugegeben wird.

Während diese beiden Sulfosäuren etwas hohe Schwefelsäure verlangen, ist das viel unlöslichere und von Schwefelsäure sehr leicht ausfällbare Indulin viel eher zu fassen. Thymusnucleinsäure färbte sich äusserst intensiv, als zu 19 ccm einer auf dem Wasserbad erhitzten 2-proc. Indulinlösung innerhalb 10 Min. 14 Tropfen 5-proc. H_2SO_4 gesetzt wurden. Die Granula waren tief schwarzblau gefärbt. Ja, man kann sogar das Erhitzen weglassen. Der Platinniederschlag aus Hefenucleinsäure wurde bei Zimmertemperatur tief schwarzblau gefärbt, als zu 1-proc. Indulin 12 Tropfen 5-proc. H_2SO_4 successiv beigemengt wurden.

Das allgemeine Princip zur sauren Färbung der Nucleinsäure ist damit gegeben: tropfenweiser Zusatz verdünnter oder etwas stärkerer Schwefelsäure zu den Farblösungen, auf 10 ccm dieser ca. 10—20 Tropfen, je nach dem Material. Auch Pikrinsäure, die aber etwas launisch ist, färbt jetzt sehr gut.

3) Natürliche Objecte erfordern, da sie ja niemals vollkommen acidophob sind, auch nur geringere Säurezusätze und werden von der Alaun-Eosinmischung der p. 104 stets äusserst intensiv gefärbt. Die Säuremenge hat sich nach der Abneigung gegen die sauren Farben zu richten. Auf Deckgläsern angetrocknete Milzbrandbacillen wurden so intensiv, wie mit Carbolfuchsin gefärbt, als zu 10 ccm 0.5-proc. Säurefuchsin in 10 Min. 8 Tropfen concentrirter Schwefelsäure gesetzt wurden. Rechnet man von den etwas grossen Tropfen 16 auf 1 ccm, so wäre also $^1/_2$ ccm verwendet worden, das Säurefuchsin enthielt also am Ende 5 Proc. Schwefelsäure. Würde man sogleich die ganze Schwefelsäure oder auch doppelt so viel zumischen, so würde die Färbung zwar auch schon sehr schön sein, aber das Maximum erreicht man durch das allmähliche Zutropfen der Säure. Ebenso bei Lichtgrün und Indulin. Durch die gleichen Säuremengen war auch das Chromatin der Kernknäuel im Hoden, das durch Flemming's Lösung secundär acidophob geworden war, mit den genannten sauren Farben auf das intensivste zu färben, zugleich mit dem übrigen Zellinhalt. Derselbe Erfolg ist noch zu verzeichnen für die Chromosomen in den mit Platinchlorid fixirten Wurzeln (p. 102).

4) Die Wirkung der Säure wird von den meisten Färbungstechnikern so aufgefasst, dass sie einerseits die Farbsäure vom Alkali befreit und ihr ausserdem durch Zersetzung der Faser eine Base zugänglich macht. Diese Ansicht geht von der Praxis aus, die im heissen

Bade färbt, und ist nicht ohne weiteres auf unsere Versuche anwendbar, die bei Zimmertemperatur und mit sehr geringem Säurezuschuss schon Erfolg hatten. GEORGIEWICZ (I, p. 594, 595), ein Vertreter der physikalischen Färbungstheorie, nimmt an, dass die Schwefelsäure deshalb besonders die Färbung befördere, weil die Salze der Farbsäure in schwefelsäurehaltigem Wasser viel weniger löslich sind, als in reinem und sich folglich leicht ausscheiden. Denn die Annahme, dass die Schwefelsäure das Farbsalz zerlegt und die Farbsäure vom Alkali befreit, ist nach GEORGIEWICZ zwar richtig, aber erschöpft nicht das Wesen des Processes. Denn es ist stets mehr Säure erforderlich, als zu einer solchen Zersetzung des Farbsalzes genügen würde.

Ich habe bereits p. 105 darauf hingewiesen, dass das durch Schwefelsäure leicht ausfällbare Indulin viel geringere Säuerung verlangt, als die schwerer fällbaren Säurefuchsin und Lichtgrün. Hierdurch wird die Annahme GEORGIEWICZ' sicher bestätigt. Auch die Beschleunigung der Färbung durch tropfenweisen Zusatz der Säure ist so leicht erklärlich. Es darf immer nur bis an die Fällungsgrenze angesäuert werden, damit nicht sofort ein Niederschlag auf der Oberfläche der Objecte sich absetzt und so den Weg ins Innere versperrt. Damit ist zunächst freilich nur die Wirkung der Schwefelsäure auf den Farbstoff erklärt, aber noch nicht die primäre Acidophobie der Nucleinsäure. Darüber vergleiche man einen späteren Abschnitt.

Die Nucleinsäuregranula selbst werden durch die Schwefelsäure nicht verändert, etwa so, wie es oben für die Faser erwähnt wurde. Denn wenn man die Granula 10 Min. lang mit verdünnter Schwefelsäure (concentrirt auf $^1/_9$) behandelt und nunmehr in säurefreie Fuchsinlösung bringt, so färben sie sich nicht. Eine chemische Vorbereitung der Granula durch die Schwefelsäure ist daher ebenso ausgeschlossen, wie eine physikalische, etwa durch Quellung, von der auch an den gesäuerten Granulis nichts zu sehen ist.

Würde man einen chemischen Eingriff der Schwefelsäure auf die Nucleinsäuregranula zu Gunsten der chemischen Theorie der Färbung verfechten wollen, so würde man auf sonderbare Widersprüche gerathen. Die Schwefelsäure könnte die Verbindung zwischen Platin und Nucleinsäure zerlegen und sich des ersteren bemächtigen, es würden also saure Affinitäten der Nucleinsäure frei. Nur diese, keine einzige basische Affinität würde die herantretende Farbsäure vorfinden, um sich mit ihr zum Farbsalz zu verbinden, wie es die chemische Theorie der Färbung annimmt. Gerade daraus, dass durch Säure die Acidophobie der Nucleinsäure überwunden wird, entspringt der chemischen Theorie ein nicht wegzuräumendes Hinderniss. Es bliebe noch der Ausweg, anzunehmen, dass die Nucleinsäure selbst zerlegt würde und Nucleinbasen daraus abgespalten würden. Um diese zu bilden, bedürfte es aber des Erhitzens der freien Säure mit Wasser (KOSSEL, I, p. 81), denn ihre Salze sind ziemlich beständig. Da ausserdem die freie Nucleinsäure durch Mineralsäure ohne Veränderung gefällt wird (KOSSEL, I, p. 80), so ist das oben gekennzeichnete Hinterpförtchen zur Herbeischaffung basischer Affinitäten gänzlich versperrt.

Ich möchte daher die vornehmste Wirkung der Säure darin erblicken, dass sie die Löslichkeit des Farbstoffes herabsetzt. Denn

seine von Anderen besonders betonte Zersetzung scheint für die Adsorptionsfärbung durchaus unnöthig, da nicht allein die freie Rosanilinsulfosäure, sondern auch die sauren Salze (das käufliche Säurefuchsin) roth gefärbt sind. Viel wahrscheinlicher ist es daher, dass die Schwefelsäure noch nebenbei die etwa dem Farbstoff beigemengten, farblosen neutralen Salze in gefärbte saure verwandelt. Auch Dissociationsänderungen könnten eine Rolle spielen. Immer bleibt aber als Hauptursache die Verminderung der Löslichkeit übrig. Der dicke Brei, in den das Eosin durch den Alaun verwandelt wird, färbt doch sicherlich aus derselben Ursache besser als die klare Wasserlösung.

Es ist noch auf das sonderbare Zusammentreffen zweier Umstände hinzuweisen. Alle sauren Farben sind in Wasser verhältnissmässig leichter löslich als die basischen, und je leichter sie sich lösen, um so mehr Schwefelsäure muss zugesetzt werden. Ferner weiss wohl jeder, wie schwer sich von Glas die letzten Reste vieler basischen Farben durch Wasser entfernen lassen, während die sauren fast gar nicht haften. Versetzt man nun die sauren Farben mit Säure, resp. das Eosin mit Alaun, so nimmt die Adhäsion am Glas sehr auffallend zu, ohne freilich die basischen Farben zu erreichen. Unter diesen ist aber auch noch eine Stufenleiter zu erkennen, vom Fuchsin, dem im Wasser schwer löslichen Salz, zu Safranin oder Methylgrün, die viel leichter sich lösen. Dazwischen steht etwa Methylenblau, Gentiana. Exact habe ich dieses Verhältniss zwischen Löslichkeit und Adhäsionsvermögen nicht gemessen. Schon der blosse Augenschein genügt aber, um diesen Gegensatz zu erkennen, der nicht ohne Einfluss auf die Färbkraft sein kann. Um den Farbstoffen das Ausfallen aus ihren Lösungen noch zu erleichtern, greift man bekanntlich zu besseren Lösungsmitteln als Wasser, z. B. Anilinwasser, Carbolalkohol. Diese fast übersättigten Lösungen sind natürlich, sobald sie mit dem wasserfeuchten Object in Berührung kommen, sofort zum Ausfallen bereit. Damit ist es dem Adsorptionsvermögen der zu färbenden Objecte wesentlich erleichtert, sich mit dem Farbstoff zu sättigen.

Kapitel IV. Färbung mit einfachen Farblösungen und Differenzirung. Succedane Doppelfärbung.

Untersucht: 1) Altmann's Säurefuchsin-Pikrinalkohol; 2) Safranin-Säurealkohol-Gentiana (Flemming-Hermann); 3) Carbolfuchsin-Säure-Methylenblau (Tuberkelbacillenfärbung); 4) Gram'sche Färbung; 5) Eisenalaun-Hämatoxylin (Benda-Heidenhain).

Der gemeinsame Charakter aller der genannten Methoden ist der, dass zunächst alles in einer Farbe möglichst intensiv mit aufdringlichen Farblösungen gefärbt wird und dann durch Differenzirungsmittel beliebig entfärbt, meist nach dem Princip der maximalen Entfärbung (Ehrlich) so weit, dass nur noch ein bestimmtes Gewebselement die erste Farbe festgehalten hat. Hierauf wird dann, wenn nöthig, zur Hervorhebung der entfärbten Theile mit einer zweiten Farbe nachgefärbt. Das Resultat ist eine Doppelfärbung, die als succedane zu bezeichnen ist, im Gegensatz zur simultanen aus Farbgemischen.

Die chemische Theorie der Färbung nimmt an, dass die zuletzt sich entfärbenden Elemente die grösste chemische Verwandtschaft zu

dem Farbstoff haben und mit ihm sehr schwer lösbare Verbindungen eingehen, während deren Beständigkeit um so geringer ist, je leichter die Entfärbung beginnt. Aber selbst die Anhänger der chemischen Theorie werden wohl am ehesten geneigt sein, die Mitwirkung physikalischer Eigenschaften bei diesen Differenzirungen einzuräumen. Unna (III, p. 11) nahm vor 10 Jahren an, dass die Differenzirung mit Säuren auf zweierlei beruht, einmal darauf, dass sie energische Lösungsmittel für Farbstoffe sind, und zweitens, dass sie die Gewebselemente physikalisch verändern, Quellung oder Schrumpfung hervorrufen oder in dieser Beziehung nicht wirken. Die gequollenen Theile sollen sich schneller entfärben als die anderen. Solche physikalischen Veränderungen der Gewebselemente durch die differenzirende Säure mögen wohl gelegentlich eingreifen, ihre Hauptwirkung beruht aber doch auf etwas anderem. Verdünnte Salz- oder Schwefelsäure, gleichviel ob mit Wasser oder mit Alkohol verdünnt, sind gar kein energisches Lösungsmittel für die basischen Farbstoffe, sondern verändern sie chemisch und verwandeln sie in die nur in freier Säure beständigen zwei- und dreisäurigen Salze, die beim Auswaschen wieder in die einsäurigen zurückgeführt werden. Die Säuren wirken meiner Ansicht nach dadurch, dass sie den im Gewebselement adsorbirten Farbstoff als mehrsäuriges Salz ausfällen, ihn den mechanischen Affinitäten entreissen und dadurch dem Lösungsmittel, Wasser oder Alkohol, zugänglicher machen. Daher combinirt sich bei der Differenzirung mit Säurealkohol diese chemische Wirkung der Säure auf den gespeicherten Farbstoff mit der des kräftigen Lösungsmittels (Alkohol). Für jede der folgenden Methoden wird das Wesen der Differenzirung noch specieller festzustellen sein.

Gegen meine früheren Versuche mit Hämoglobin (II, p. 772) könnte vielleicht eingewendet werden, dass durch die verschiedenen Fixirungsmittel verschiedene chemische Verbindungen entstanden waren, die nicht so fuchsinophil waren, wie die granuläre Alkoholfällung. Nach p. 46 lassen sich die ungleich grossen Granula des Alkoholniederschlags sehr schön gegen einander differenziren durch Altmann's Granulafärbung oder Eisenhämatoxylin (Taf., Fig. 1) oder Gram. Hier liegt doch sehr wahrscheinlich nur derselbe Körper, das von Alkohol gefällte Hämoglobin vor, und dennoch gelingen chromatophile Doppelfärbungen. Das ist nur möglich, wenn diese auf rein physikalischen Ursachen, die in dem ungleichen Durchmesser der Granula sich aussprechen, beruht. Zum weiteren Beweis hierfür sind die schönen Granulagemische aus Platin- oder Chromalbumose (p. 38) sehr geeignet, besonders auch desshalb, weil mit denselben Gemischen auch simultane Doppelfärbungen gelingen.

1. Säurefuchsin-Pikrinalkohol.

(Granulafärbung nach Altmann.)

Bekanntlich hat Altmann (I) diese Färbung im Anschluss an eine Fixirung mit Kaliumbichromat-Osmiumsäure für ein specifisches Reagens auf die Zellgranula, die Bioblasten, erklärt, und viele andere Forscher haben sich ihm angeschlossen. Nachdem im ersten Theil

das specifische Fixirungsmittel geprüft wurde, ist nunmehr die Färbung zu untersuchen.

Trotz der hohen Concentration des Säurefuchsinses (20 Proc. in Anilinwasser) ist doch seine Färbkraft noch nicht so gehoben, dass sie die Acidophobie der Nucleinsäure überwinden könnte. Die Platinfällung der Thymusnucleinsäure blieb vollkommen farblos. Das Anilinwasser frisst bei längerer Wirkung diese Granula an und löst sie endlich, 2—3 Min. nur schädigen nicht. Scheinbar besteht eine merkwürdige Uebereinstimmung zwischen der Unfärbbarkeit der Nucleinsäuregranula und der Farblosigkeit der Zellkerne im ALTMANN'schen Granulapräparat. Aber doch nur scheinbar, denn die Kerne sind zuerst auch gefärbt und entfärben sich im Pikrinsäure-Alkohol nur schneller als die Granula. Hat man statt mit ALTMANN's Osmiumgemisch mit Platinchlorid oder mit HERMANN'scher Lösung fixirt, so färbt das Säurefuchsin die Zellkerne in der Magen- und Darmwand des Hundes oder in dessen Speicheldrüse so intensiv und fest, dass sie jetzt länger die Farbe halten als die ALTMANN'schen Granula. Diese Erscheinung ist leicht verständlich dadurch, dass das Nuclein des Kernes wohl von Platinchlorid gefällt wird, aber nicht von Osmiumsäure und Kaliumbichromat, die also ihr secundäres Adsorptionsvermögen nur den Zellgranulis, deren Substanz gefällt wird, aufprägen können. In den mit dem genannten Gemisch fixirten Objecten wird das Kernnuclein erst vom Einbettungsalkohol in unlösliche Form übergeführt.

Sehr leicht überwindet die starke Farblösung die secundäre Acidophobie, die Platin und Osmium ertheilen, besonders wenn nach ALTMANN's Vorschrift erwärmt wird.

Die Sublimatfällung der Deuteroalbumose wird durch den Pikrinsäurealkohol langsam gelöst und ist desshalb nur bei sehr grosser Vorsicht zu differenziren. Alle anderen Granula aus Albumose aber (mit Chromsäure, Kaliumbichromat, ALTMANN's, FLEMMING's und HERMANN's Lösung, Platinchlorid, Formaldehyd 10-proc.) geben prächtige und ganz übereinstimmende Bilder. Die grossen Granula sind intensiv roth gefärbt, fuchsinophil, alle kleineren entfärbt, pikringelb. Niemals wird man von einer gewissen, durch den Differenzirungsgrad bestimmbaren Grösse abwärts auch nur ein einziges roth gefärbtes Körnchen finden (Taf., Fig. 11, 19). Schon daraus, dass ich durch beliebige Unterbrechung der Pikrinbehandlung die Fuchsinophilie der Granula verschieben kann, ist zu folgern, dass die Differenzirung rein physikalisch verläuft. Niemals wird es aber mit dieser Methode gelingen, die grossen Granula zu entfärben und die kleinen fuchsinophil zu machen. Um eine solche Inversion der Granulafärbung herbeizuführen, muss man zur simultanen Doppelfärbung greifen, zu einem Gemisch aus Pikrinsäure und Säurefuchsin. In dem Niederschlag aus 40-proc. Deuteroalbumose mit 1-proc. Chromsäure oder 2,5-proc. angesäuertem Kaliumbichromat färben sich die grossen und mittleren Granula rein pikringelb, alle kleineren und kleinsten intensiv roth (Taf., Fig. 12) in einem Gemisch von 10 ccm 0,2-proc. Pikrinsäure + 5 ccm 0,1-proc. Säurefuchsin (Färbezeit 6 Minuten; einfache Wasserspülung). Auch die grossen Granula aus Platinalbumose (1 + 10 $PtCl_4$) färben sich intensiv gelb, die kleinen roth durch Simultanfärbung aus folgendem Gemisch: 0,5-proc. Pikrin-

säure 8 ccm, 0,5-proc. Säurefuchsin 3 ccm, Wasser 19 ccm. Nur bedarf es bei der oft erwähnten Acidophobie einer längeren Färbezeit, 60 Minuten.

Für die färbungstheoretische Erklärung der Differenzirungsfärbungen sind diese Inversionen ausserordentlich wichtig. Sie zeigen, dass bei gleichzeitiger Darbietung von Säurefuchsin und Pikrinsäure etwas ganz anderes entscheidet als bei der ALTMANN'schen Granulafärbung. Wenn sie auf chemischer Grundlage die grossen Granula fuchsinophil färbte, so müssten diese sich doch in dem Gemisch ebenso färben. Statt dessen tritt Inversion ein, bedingt, wie hier nur anzudeuten ist, durch die grössere relative Diffusionsconstante der Pikrinsäure, während im anderen Falle die grossen Granula fuchsinophil bleiben, weil sie als die dichteren, substanzreicheren den Farbstoff stärker adsorbiren und daher gegenüber der lösenden Pikrinsäure fester halten als die kleinen.

Dass die ALTMANN'sche Färbung kein specifisches Reagens auf Zellgranula ist, folgt hieraus von selbst. Nicht einmal als Reagens auf ursprüngliche, vorgeformte Granulationen ist sie zu benutzen, da sie Fällungsgranula mit unfehlbarer Sicherheit färbt.

Wenn man die Pikrinsäurebehandlung sehr vorsichtig abpasst, dann kann man auch in den grossen Granulis den Spiegel allein roth färben, den Rand gelb (Taf., Fig. 11). Bei der Inversion in Gemischen färbt sich natürlich das Centrum rein gelb und ist von einem leuchtend rothen Rand umsäumt (Taf., Fig. 12).

2. Safranin-Säurealkohol-Gentiana.

Die Farbstoffe wurden in 1-proc. Lösungen in 90 ccm Anilinwasser + 10 ccm Alkohol (96°) auf die Präparate auffiltrirt. Mit Safranin wurde 5—15 Minuten gefärbt, mit Wasser gespült und nun mit 0,1 Proc. HCl enthaltendem Alkohol differenzirt, der schnell mit Wasser entfernt wird, um den Grad der Entfärbung zu controliren. Genügt diese noch nicht, so wird nochmals differenzirt. Dann kommt die Nachfärbung mit Gentiana (1 Minute), der eine abermalige Differenzirung mit Säurealkohol folgt. Eine Weiterbehandlung der Präparate mit Methylorange (nach FLEMMING) unterblieb, weil sie principiell Neues nicht bietet, da ja der Hauptwerth der Methode allgemein darin gesehen wird, dass sie die Chromosomen safranophil, die chromatischen Substanzen des ruhenden Kernes, der Anfangsform des Monospiremes und der Endform des Dispiremes gentianophil färbt (HERMANN, I, p. 60; FLEMMING, III, p. 697). Hierin erblickt die chemische Theorie der Färbung das Anzeichen für eine chemische Umwandlung der Kernsubstanz während der Mitose. Ich habe in einer früheren Mittheilung (III, p. 6) schon darauf hingewiesen, dass man sowohl an künstlichen Granulis, als auch an Mitosen (Wurzelspitzen von Vicia Faba) die Chromatophilie umkehren kann, wenn man von der wohl rein zufällig entstandenen Reihenfolge abweicht und mit dem Gentiana beginnt (Taf., Fig. 17, 18). Auch ROSEN (I, p. 4, 5) hat für einige succedane Doppelfärbungen, die der hier besprochenen Methode nachgebildet sind und principiell ganz mit ihr übereinstimmen, Inversion durch Umkehr der Farbenfolge erzielt. Nur zieht er daraus nicht den allein richtigen

Schluss, dass solche Färbungen der chemischen Grundlage ganz entbehren müssen. Denn wäre die Safranophilie der Chromosomen chemisch, so würde folgende Ueberlegung eine Inversion der Färbung ganz unmöglich erscheinen lassen. Vorausgesetzt, dass die Chromosomensubstanz zum Safranin eine grössere chemische Verwandtschaft hätte als zum Gentiana, so müsste, wenn sich erst die leichter zerstörbare, auf geringerer Affinität beruhende Verbindung Chromosom-Gentiana gebildet hätte, diese durch Nachbehandlung mit Safranin zerlegt werden, genau wie Baryum das Natrium in Natriumsulfat verdrängt. Da die Inversion aber ganz leicht gelingt, so kann eine stärkere oder schwächere Verwandtschaft nicht bestehen.

Verfolgt man an einem Granulagemisch aus Platinalbumose die einzelnen Stadien der Doppelfärbung in herkömmlicher und inverser Reihenfolge, so sieht man zunächst alles in der ersten Farbe gefärbt, nach deren Differenzirung treten nur die grossen Granula noch intensiv gefärbt hervor. Nach der Behandlung mit der zweiten Farbe sind alle Granula in dem neuen Ton gefärbt, auch die grossen, die noch die erste Farbe enthalten. Diese wird also von der zweiten überdeckt. Die nun folgende Differenzirung mit saurem Alkohol hat den Zweck, nur den überdeckenden Farbstoff aus den grossen Granulis (resp. den Chromosomen) zu entfernen, ohne gleichzeitige Entfärbung der kleinen Granula. Diese heikle Aufgabe wird dadurch erleichtert, dass die zweite Farbe von den grossen Granulis weniger fest adsorbirt wird als die erste und daher leicht zu extrahiren ist. Immerhin kommt es sehr auf ein glückliches Abpassen der Säurewirkung an, weshalb stets eine grosse Zahl von Zwischennuancen zwischen den reinen Farben zu sehen sind, nicht bloss in den Granulapräparaten, sondern auch in den Mitosen. Die Erfolge der Methode werden noch dadurch beeinträchtigt, dass der zweite Farbstoff in einem guten Lösungsmittel (Anilinwasseralkohol) für den ersten einwirkt und so nicht bloss färbend, sondern auch entfärbend auf die vom ersten Farbstoff noch nicht entblössten Theilchen wirken muss. Um diesen Uebelstand zu umgehen, ist mit der zweiten Farbe möglichst kurze Zeit nur zu behandeln. Oder man könnte eine rein wässrige, dünne Lösung vorziehen. Dann verliert aber die Inversion an Bedeutung, denn gerade das, dass beide Farbstoffe in gleichartiger Lösung und gleicher Concentration wirken, ist das Maassgebende für die Theorie.

Die eben entwickelten Anschauungen über den Werth der Methode gelten natürlich auch für alle ihr gleichenden, bei denen nur andere Farbstoffe verwendet werden.

Die aus annähernd gleichgrossen Granulis bestehende Fällung von 10-proc. Nucleinsäure mit 10-proc. $PtCl_4$ ist für Doppelfärbungen weniger geeignet, weil die dazu erforderlichen Grössenunterschiede fehlen. Einige brauchbare Stellen wird man aber in jedem Präparate finden. Nur muss man, da Salzsäure die Granula leicht deformirt, den Alkohol schwach mit Essigsäure versetzen. Prachtvolle Bilder liefert aber die gemischte Fällung mit (1 + 10) $PtCl_4$. Bei üblicher Reihenfolge sind die Granula roth, die feinkörnigen Gerinnsel violett (Taf., Fig. 35), bei inverser die letzteren roth und die ersteren violett (Taf., Fig. 36). Es lässt sich kaum ein schönerer Parallelfall zu den bekannten Angaben Flemming's (III, p. 697) und Hermann's (I, p. 60) ausdenken, der den

Verhältnissen in den Zellkernen, deren Färbungsvermögen man ja gern Nucleinkörpern zuschreibt, besser entsprechen würde als der beschriebene. Während der Mitose sammelt sich das zunächst in den feinen Kerngerüsten der Autoren vertheilte Chromatin zu den compacten Chromosomen, aus denen es dann in den Tochterkernen wieder in die fein gerinnselige Vertheilung zurückkehrt. Mit Safranin-Gentiana färben sich nach den genannten Autoren die Chromosomen intensiv roth, die zarten Gerüste der ruhenden Kerne und der Anfangs- und Endstadien der Spireme violett. Kehrt man die Farbfolge um, so wird auch die Chromatophilie invers. Einzig und allein wie bei der Thymusnucleinsäure (1 + 10 $PtCl_4$) desshalb, weil der zuerst dargebotene Farbstoff von den substanzreichen, compacten Chromosomen stärker adsorbirt wird als von den zarteren und weniger dichten Chromatinnetzen. Nur über diesen Wechsel in der Ablagerungsform des als Chromatin bezeichneten Kerninhaltes gibt die Färbung Aufschluss, nicht über chemische Veränderungen, die damit ja verbunden sein können, aber zum Färbungserfolg nicht erforderlich sind.

Dass alle Granulafällungen der Deuteroalbumose normale und inverse Doppelfärbungen geben, braucht nicht besonders geschildert zu werden (Taf., Fig. 17, 18). Auch Spiegelfärbung gelingt, nur bedarf es sehr sorgfältiger Differenzirung, dann gelingt es aber auch normal und invers, z. B. sehr schön mit Fällungen von 20-proc. Deuteroalbumose durch 1-proc. Chromsäure (Taf., Fig. 26).

Nachdem sich gezeigt hat, dass der Färbungserfolg dieser so allgemein benutzten Methode jeder chemischen Grundlage entbehrt, ist es wohl kaum nöthig, noch an weiteren Beispielen aus der Literatur darzulegen, wie unberechtigt die Folgerungen sind, die herkömmlicher Weise gezogen werden. Die Ungleichmässigkeit der Resultate lässt sich nicht schöner illustriren als durch einen Satz, mit dem Reinke (I, p. 262) seine Modification des Flemming'schen Verfahrens empfiehlt: „Das Resultat ist nur im Farbenton etwas variirend. Entweder sind die Chromosomen blau, die Centralkörperchen, die Spindel und sonstigen achromatischen Fäden roth, oder die Chromosomen roth und das Uebrige blau, oder es treten Mischfarben auf.“ Und trotz solcher Schwankungen werden die Färbungen noch als chemische Reactionen aufgefasst. Selbst in einem Spülichtfass eines chemischen Laboratoriums herrscht mehr Ordnung und Aequivalenz.

Aber nicht allein die verschiedenen Ablagerungsformen des Chromatines (Chromosom — Kerngerüst) lassen sich durch die Safranin-Gentianafärbung nicht chemisch, sondern nur physikalisch charakterisiren, auch zwischen Kern und Cytoplasma gestattet die Methode keine andere Trennung. Desshalb kann ich auch manchen Schlussfolgerungen Strasburger's nicht beistimmen. So beobachtete er (III, p. 166, 167, 193), dass die Spindelfasern sich violett färben, wie der Nucleolus, und folgert hieraus, unterstützt durch einige morphologische Nebenumstände, dass die Substanz des Nucleolus zur Bildung der Spindelfasern dient. Da nun die Verbindungsfäden zwischen den neuen Tochterkernen sich zunächst noch violett färben, später aber in allen Nuancen braun, wie das Cytoplasma, so soll dieser Umschlag in der Färbung (III, p. 193) ein Mittel an die Hand geben, den sicheren Uebergang der Verbindungsfäden ins Cytoplasma zu verfolgen. Alles dies freilich nur, wenn die

Färbung chemisch wäre. Später dagegen (IV, p. 379) wird diesen Färbungsbildern ein anderer Werth beigelegt, denn STRASBURGER ist zu der Ueberzeugung gekommen, dass die „Tinctionsfähigkeit des Kinoplasmas sich je nach dem Grade seiner Activität ändert". Da nun in den Pollenmutterzellen von Larix die „Abnahme der Violettfärbung des Kinoplasmas" mit dem Augenblick zusammenfällt, „wo die Nucleolarsubstanz sich wieder in den Kernen sammelt", so folgert STRASBURGER (III, p. 379), dass „die Nucleolarsubstanz in Beziehung zur Activirung des Kinoplasmas stehe". Die ganze Beweisführung, der noch viele andere sich anreihen liessen, stürzt in sich zusammen, sobald der rein physikalische Charakter der Färbung festgestellt ist. Es brauchen ja nur die Spindelfasern oder sonstigen Theile des „Kinoplasmas" substanzärmer zu werden, sogleich werden sie eine andere Färbung behalten, ohne sich stofflich verändert zu haben.

Inversion von Kern- und Plasmafärbung. An die Inversion der Safranin-Gentianafärbung, die ausser an Viciawurzeln auch noch am menschlichen Hoden (FLEMMING-Fixirung) tadellos gelang, schliessen sich am besten Versuche an, den Kern mit sauren, das Cytoplasma mit basischen Farben invers zu tingiren. Dass man mit ALTMANN's Säurefuchsin-Pikrinalkohol Chromosomen und Nucleolen in Viciawurzeln (Platinchlorid-Fixirung) oder die Kernknäuel im menschlichen Hoden tief roth, das Cytoplasma und die ruhenden Kerne pikringelb färben kann, bedarf kaum der Erwähnung.

Viel frappanter werden die Bilder, wenn man eine wässrige Lösung der sauren Farben durch Zusatz von Säure, resp. Alaun farbkräftiger macht, mit schwachem Laugenalkohol differenzirt und nun mit einer basischen Farbe, einem sog. Kernfarbstoff, das Cytoplasma gegenfärbt. Neben reinen Contrastfarben erscheinen auch hierbei zahlreiche Mischtöne, die ja auch bei FLEMMING's Safranin-Gentiana und ähnlichen Verfahren nicht fehlen. Sind die Präparate „gut gelungen", dann herrschen die reinen Farben auch bei der neuen Inversion vor. Gerade jene Mischtöne sind aber ein weiterer Beleg dafür, dass die Election keine chemische sein kann, denn bestünde wirklich zu einem der beiden verwendeten Farbstoffe eine grössere chemische Verwandtschaft als zum anderen, so müsste sich das Gewebselement mit diesem sättigen und für den anderen ganz unzugänglich sein, besonders da es sich ja hier um den Gegensatz von Säure und Base handelt.

Neu bei diesen Inversionsfärbungen ist ausser der sauren Färbung des Chromatines mit einem „Plasmafarbstoff" noch die Differenzirung mit schwach alkalischem Alkohol (0,1-proc. KOH). Würde man sauren Alkohol benutzen, wie für die basischen Farben, so würde die Entfärbung nicht erleichtert, sondern erschwert, weil die Säure den Farbstoff nicht chemisch angreift und daher seine Bindung durch Adsorption nicht auflockern kann. Die sauren Farben werden aber gerade durch Basen alterirt.

Ein Beispiel sei noch genauer beschrieben, menschlicher Hoden nach FLEMMING'scher Fixirung. Die aufgeklebten Schnitte kommen in 2-proc. Lichtgrün, dem auf 9 ccm ca. 12 Tropfen Schwefelsäure innerhalb 10 Minuten zugesetzt werden. Jetzt ist der ganze Schnitt total und intensiv grün gefärbt und wird, nach Abspülen mit Wasser, kurz mit dem Laugenalkohol differenzirt. Dieser darf nur sehr kurze Zeit wirken und muss sofort mit Wasser abgespült

werden. Nunmehr vielleicht 15—30 Secunden lang 0,1-proc. Safranin—Alkohol—Xylol—Balsam. Der Erfolg ist, dass die Kernknäuel rein und intensiv lichtgrün, das Cytoplasma aber schön safraninroth gefärbt ist. Man kann oft auch Stellen finden, wo die tieferen Schichten des ca. 5 μ dicken Schnittes die geschilderte schöne Contrastfärbung zeigen, während an der Oberfläche alles roth gefärbt ist, ja in einem und demselben Kernknäuel kann man die in die Tiefe des Schnittes verlaufenden Theile rein grün, die zur Oberfläche aufsteigenden rein roth und daneben auch Mischtöne finden.

Nach der geschilderten Methode wurden die Chromatinknäuel des Hodens mit Säurefuchsin, Indulin und Eosin (Alaunzusatz) intensiv gefärbt, das Cytoplasma war bei Indulin wieder mit Safranin gefärbt, bei den anderen mit Gentiana. Da das Object die heissen Lösungen der sauren Farben (2-proc.) schon ohne Säurezusatz recht gut aufnimmt, so kann man auch auf diese Weise zum Ziele kommen. Brillanter werden allerdings die Bilder bei saurer Färbung, resp. bei Eosin mit Alaunzusatz. Ebenso die Mitosen der Viciawurzeln. Es bedarf wohl kaum der Erwähnung, dass die umgekehrte Tinction leicht zu erreichen ist, also die Farbenordnung, die nach der üblichen Auffassung die chemischen Eigenschaften des Chromatines und Protoplasmas wiederspiegeln soll.

3. Carbolfuchsin - Säure - Methylenblau.

Tuberkelbacillenfärbung.

Carbolfuchsin (Ziehl), 2—3 Minuten leicht erwärmt, Wasser, 5-proc. Schwefelsäure sehr kurze Zeit, schnell in Wasser und nöthigenfalls nochmals in Schwefelsäure-Wasser, 0,1-proc. Methylenblau circa 15 Secunden.

Auch diese den Bacteriologen wohlbekannte Methode veranschaulicht nur die schon oft erwähnten physikalischen Differenzen, keine chemischen. Die Säure überwindet die Adsorptionskraft der zarteren Elemente und verbindet sich mit dem Farbstoff zu dem nur in saurer Lösung beständigen, gelbbraunen zwei- und dreisäurigen Salzen der Rosanilinbase, weshalb sich die Präparate beim Eintauchen in die Schwefelsäure entsprechend umfärben. Wird jetzt in Wasser abgespült, so überwiegt dessen Lösungskraft für das wiederentstehende rothe Farbsalz über die Adsorption und die Entfärbung beginnt. Diejenigen Elemente aber, wie die grossen Granula einer Deuteroalbumosefällung mit (1+10) $Pt\,Cl_4$ (Taf., Fig. 20) oder mit Chromsäure (Taf., Fig. 28), halten den Farbstoff so fest, dass nur ein Theil davon in das mehrsäurige Salz umgewandelt und dann ausgewaschen wird, der Rest erscheint beim Abwaschen in den roth gebliebenen Granulis, Tuberkelbacillen, Bacteriensporen. Immer handelt es sich um die gleiche Erscheinung, nicht um chemische Bindung. Auch bedarf es zur Erklärung der Tuberkelbacillenfärbung keiner neuen Annahme. Ehrlich's (III, p. 130) Voraussetzung, dass eine Hülle mit besonderen Eigenschaften den Leib des Tuberkelbacillus umschliesse und seine Tinction bedinge, ist ganz überflüssig. Die Hülle soll von Mineralsäuren nur langsam durchdrungen werden, aber in Berührung damit für complexe Molekel (d. h. des Farbstoffes) fast vollkommen undurchgängig werden; im Gegensatz hierzu soll

durch Alkalien ihre Permanbilität gesteigert werden. Auf diese Weise sucht EHRLICH die auf schwankenden Füssen stehende chemische Theorie der Bacillenfärbung zu retten. Die Hülle mit den ihr angedichteten Eigenschaften ist doch nur ein Wort, das die bei der Entfärbung zu beobachtenden Erscheinungen inhaltslos zusammenfasst. In Wirklichkeit fusst die ganze Manipulation nur auf dem grösseren Substanzreichthum des Tuberkelbacillenprotoplasmas und seiner daraus sich ergebenden grösseren Adsorption. Die Versuche mit den Albumosegranulis lehren das ohne weiteres, die grossen bleiben roth, die kleinen werden entfärbt und lassen sich mit Methylenblau genau so nachfärben, wie in phthisischen Sputen andere Bacterien und Gewebselemente (Taf., Fig. 20, 28).

Auch KOCH's (I, p. 9) Annahme, dass die Intensität und Zähigkeit der Färbung auf dem Gehalt einer in Alkohol unlöslichen Fettsäure beruhe, ist zu verwerfen. Denn wenn nach Behandlung mit heisser Natronlage, die allmählich die Fettsäure in winzigen Tröpfen hervortreibt, die Tuberkelbacillen sich ebenso schnell entfärben wie die übrigen Bacterien, so hat das sicherlich eine andere Ursache. Die Natronlage lockert im Allgemeinen den Inhalt der Zelle und vermindert dadurch seine mechanischen Affinitäten für den Farbstoff. Es bedarf wohl keines weiteren Beweises, dass heisse Natronlauge für Eiweisskörper aller Art ein ausgezeichnetes Lösungs- und sogar Zerstörungsmittel ist und hieraus ihre Hauptwirkung sich erklärt.

Nicht anders sind die Grundlagen für die Sporendoppelfärbungen, nur kommt neu hinzu, dass die erste Einlagerung des Carbolfuchsines in die Spore besonderer Kniffe bedarf, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Dass die bacteriologische Methode auch zur Untersuchung granulahaltiger Gerinnsel, zur Spiegeldifferenzirung der grossen Granula sich eignet und hieraus weitere Belege für ihre rein physikalische Basis sich ableiten lassen, bedarf wohl nur der Erwähnung. Nur hat man darauf zu achten, dass 5-proc. Schwefelsäure ziemlich stürmisch differenzirt und anderseits das Methylenblau sehr hohe Deckkraft besitzt. Bei geschickter Berücksichtigung dieser Umstände erhält man schön rothe Centren, von einem blauen Ring umgeben (Taf., Fig. 28)

Besonders eignen sich hierzu solche Granulas, die durch nachträgliche Einlagerung von Albumose und secundäre Fixirung dieser viel substanzreicher und dichter geworden sind (Taf., Fig. 28). Man kann jetzt mit 5-proc. Schwefelsäure mehrere Minuten behandeln, ohne vollständig zu entfärben. Aber auch Platinalbumose ist gut zu brauchen.

4. GRAM'sche Methode.

Färbung mit Anilinwassergentiana (1-proc.) 2—3 Minuten, Wasser, Jodjodkalium (LUGOL'sche Lösung) 2—3 Minuten, Wasser, Alkohol zur Differenzirung, Nachfärbung beliebig mit Tropäolin, Safranin, Eosin etc. Langsamer und sanfter als bei den drei vorigen Methoden verläuft hier in säurefreiem Alkohol die Entfärbung, und daher ist sie feiner regulirbar. Hieraus erklärt sich auch die grössere Leistungsfähigkeit der Methode geringeren Dichtigkeitsdifferenzen gegenüber. Die zahlreichen Bakterien, die nach GRAM gefärbt bleiben, würden es nicht bei der Tuberkelbacillenfärbung

sein, die eben gerade dadurch, dass sie nur grössere Dichtigkeitsdifferenzen veranschaulichen kann, specifisch wirkt, aber auch nur dadurch. Würde man nach der Färbung mit Carbolfuchsin mit viel schwächerer Säure differenziren, so würden sicherlich alle die Bacterien, die „nach GRAM“ sich färben, ebenfalls noch roth sein.

GOTTSTEIN (I, p. 629) meint, dass das Jodkalium als Salz den Farbstoff aus der Verbindung mit den Gewebselementen ausfälle und so für die Lösung durch Alkohol vorbereite. Dem Jod wird keine Wirkung zugeschrieben. In der That fällt eine 1-proc. Jodkaliumlösung das Gentianaviolett aus seiner wässrigen Lösung aus, und diese Fällung ist in Alkohol augenblicklich wieder löslich. Noch stärker wird der Niederschlag mit Jodjodkaliumlösung, dessen Jod also die Wirkung des Jodkaliums erhöht. Damit ist GOTTSTEIN's Ansicht sichergestellt und nur noch dahin zu ergänzen, dass die Jodlösung die mechanischen Affinitäten, welche das Gentiana fesseln, überwindet und so sein Auswaschen durch Alkohol befördert. Auch UNNA's (II, p. 58) Ansicht, dass der differenzirende Einfluss des Jodes auf seine chemische Verwandtschaft zum Pararosanilin beruht, läuft auf dieselbe Erklärung hinaus, nur hat UNNA, als Anhänger der chemischen Theorie der Färbung, nicht die Ueberwindung der Adsorption hervorgehoben.

Die GRAM'sche Methode, als rein physikalische, sortirt die mit Formaldehyd oder Platinchlorid oder Kaliumbichromat gefällte Albumose genau so nach der Granulagrösse, wie die anderen succedanen Doppelfärbungen. Immer widerstehen die grossen Granula der Entfärbung länger als die kleinen, die nunmehr contrast gefärbt werden können (Taf., Fig. 27, 30).

Da die Differenzirung hier langsam fortschreitet und sich bequem reguliren lässt, so ist GRAM's Methode noch mehr, als die bisher besprochenen, dazu geeignet, Spiegel zu geben. In folgenden Fällungen von Deuteroalbumose waren Spiegel aller mittelgrossen und sehr grossen Granula durch GRAM's Methode elegant hervorzurufen: 20-proc. mit 1-proc., 2,5-proc. oder 5-proc. Chromsäure (Taf., Fig. 27), 40-proc. mit 2,5-proc. Chromsäure, 2,5-proc. Kaliumbichromat, (1+10) Pt Cl_4, 4-proc. Formaldehyd (Taf., Fig. 30). Besonders fiel in der letzteren Fällung, die neben rein kugeligen Granulis auch zahlreiche abweichend gestaltete, längliche und knorrige Formen enthielt, auf, dass der violett gefärbte Kern genau dem äusseren Umriss entsprach (Taf., Fig. 30), genau wie bei einem Zwillingsphärokrystall. Als solche hat man auch die unregelmässigen Körperchen der Formalinfällung aufzufassen. Ueber Differenzirung von Gemischfällungen und über Färbung der Hämoglobingranula mit der GRAM'schen Methode wurde schon gesprochen. Sublimatfällungen werden von ihr gelöst oder doch, selbst bei sehr kurzer Anwendung des Jodjodkaliums, theilweise zerstört.

Da für die Nucleinsäure Abweichungen nicht zu erwarten waren, so unterblieb eine besondere Untersuchung. Das Neue an der GRAM'schen Methode gegenüber der unter No. 2 behandelten Reihenfolge Gentiana — Säurealkohol — Safranin ist ja nur die Einschiebung der Jodlösung vor der Differenzirung. Da hierdurch eine Abweichung bei der Deuteroalbumose nicht herbeigeführt wurde, so werden sich die Nucleinsäurefällungen wohl ebenso verhalten.

5. Eisenalaun-Hämatoxylin.

Beizung der Präparate 5—15 Minuten lang mit 1,5-proc. Ammoneisenalaun, kurzes Abspülen, Färbung 15 Minuten, bei einigen bis 20 Stunden in $^1/_2$-proc. Hämatoxylin in Wasser, Abspülen, Differenziren mit Eisenalaun, Wasser, Contrastfärbung mit Tropäolin, Eosin, Safranin etc.

Diese allmählich von Benda-Heidenhain nach der technischen Blauholzfärberei ausgebildete Methode leistet noch mehr als die vorige in der Hervorhebung und Festhaltung geringer Dichtigkeitsdifferenzen. Sie gestattet, in ein feines Gerinnsel eingestreute sehr kleine Albumosegranula noch sicher durch schwarze Farbe herauszuheben, auch dann, wenn die übrigen Methoden der succedanen Doppelfärbung versagen oder wenigstens unzuverlässig werden. Das beruht auf der langsamen Lösung des mit dem Eisenalaun erzeugten Blauholzschwarzes, das im Ueberschuss der Beize sich wieder löst (vergl. auch Rawitz, I, p. 73; III, p. 75).

Da die Einlagerung der Beize doch sicherlich denselben Gesetzen unterworfen ist, wie die der Farbstoffe, so hat die Werthschätzung der Methode von der Aufnahme des Ammoneisenalaunes auszugehen. Das Ammoneisenalaun ($2\,SO_4\,Fe\,NH_4$) ist ein Ferrisalz, das wie alle Ferrisalze in wässriger Lösung theilweise in freie Säure und colloidal gelöstes Eisenoxyd gespalten ist (Ostwald, I, p. 126). Daher reagirt seine Lösung sauer. In der Färbereipraxis können die Ferrisalze, z. B. Ferrisulfat, nicht in ihrer ursprünglichen sauren Lösung verwendet werden, sondern man stellt sogenannte basische Ferrisulfate dar (Hummel, I, p. 131), in denen wahrscheinlich das colloide, nicht diffundirende Ferrioxyd in wasserlösliches, diffundirendes Ferrihydroxyd verwandelt ist. Nur als basische Salze können die Ferrisalze als Beizen verwendet werden, jedenfalls desshalb, weil in den normalen Salzen das abgespaltene colloidale Eisenoxyd nicht in die Fasern eindringt, nicht adsorbirt wird.

Die Nucleinsäuregranula, sowohl der Thymus- als der Hefesäure, nehmen die Beize nicht an und können daher auch nicht mit dem wässrigen Hämatoxylin gefärbt werden, ein schwaches Rauchgrau ist das Kräftigste, was sich erreichen lässt. Die Analogie mit der Acidophobie gegen saure Farben ist vollkommen; wahrscheinlich würde dass Ammoneisenalaun als basisches Ferrisalz adsorbirt, was noch zu untersuchen ist. Eine weitere Uebereinstimmung besteht darin, dass durch Einlegen der Nucleinsäuregranula in eine Deuteroalbumoselösung (z. B. 5-proc.) ihre Acidophobie sowohl als auch die Abneigung gegen die Alaunbeize überwunden wird; mit allen sauren Anilinfarben gibt es jetzt intensive Färbungen, mit Eisenhämatoxylin tiefste Schwärzung.

Zur Ergänzung sei bereits hier bemerkt, dass die Nucleinsäuregranula auch mit Delafield's Hämatoxylin sich nicht so intensiv färben, wie mit den basischen Anilinfarben.

Alle Granulafällungen der Deuteroalbumose lassen sich mit Eisenhämatoxylin ausgezeichnet sortiren, die grossen Granula bleiben schwarz, die entfärbten kleinen kann man beliebig nachfärben, und je nachdem man die Entfärbung früher oder später unterbricht, wird man ein verschiedenes Bild erhalten. Nicht bloss die oft genannten Fällungen von 40-proc. Albumose mit $Pt\,Cl_4$

Chromsäure, Kaliumbichromat oder Formaldehyd wurden damit untersucht, auch die Granulagemische aus 3-, 5-, 10-proc. Albumose, erzeugt mit Flemming'scher oder Hermann'scher Lösung, mit Altmann's Bichromatosmiumsäure, mit Sublimat, liessen sich ausgezeichnet differenziren. Nicht weniger schön waren die Bilder, die mit den Hämoglobingranulis aus Alkohol gewonnen wurden, immer wieder entsprechend der Grösse war das Blauholzschwarz festgehalten oder von den kleineren abgegeben worden (Taf., Fig. 1). Die in Gerinnsel eingebetteten Granula wurden stets prachtvoll differenzirt, auch bei Sublimatfällungen, denen gegenüber ja Altmann's Säurefuchsin-Pikrin ganz versagt und die Gram'sche Methode nur unsicher wirkt (vergl. Mischung II, VII, Taf. Fig. 3, 9, 10).

Noch eleganter als mit der letzteren tritt mit Benda-Heidenhain's Methode die Spiegelfärbung ein. Hat man den richtigen Grad der Entfärbung getroffen, so gelingt es selbst in kleinen Granulis ein winziges schwarz gefärbtes Pünktchen im Centrum sichtbar zu machen. Man kann in kurzer Zeit alle Uebergänge zusammensuchen von kleinen Granulis mit punktförmigem, eben erkennbarem Centrum bis zu den grossen, deren Spiegel schon ansehnlichen Durchmesser hat (Taf., Fig. 29, und Fig. 2 p. 34). Wie kleine Schützenscheiben mit ihrem schwarzen Spiegel lagen die Granula da. Besonders gelingt es auch sehr schön in der Sublimatfällung der Albumose, allgemein die schönsten Spiegel hervorzuheben (Fig. 2 p. 34), über die ich Näheres in dem Kapitel über Centralkörperchen und Sphären zu vergleichen bitte.

Die Eisenhämatoxylinfärbung leistet jedenfalls das Beste von allen Differenzirungsmethoden, wenn es sich um die Hervorhebung kleiner Granulationen im feingerinnseligen Protoplasma handelt. Weiteres findet man in dem eben citirten Kapitel über die Centralkörperchen.

Kapitel V. Färbung mit Farbgemischen ohne Differenzirung, simultane Doppelfärbung.

Als man nach unendlichen Recepten das Widrige zusammengoss und darin zu färben begann, schien eine neue und untrügliche Grundlage für die chemische Theorie der Färbung geschaffen zu sein. Denn die ganz farbenreinen doppelten und dreifachen Färbungen, die man aus trüben Farbgemischen hervorgehen sah, konnten doch nur auf der chemischen Affinität der Zellbestandtheile zu den im Gemisch dargebotenen Farbstoffen beruhen. Die Election der sauren und basischen Farben war nach Hüppe (II, p. 71) „physikalisch vollständig unverständlich und nur durch chemische Verbindung zu begreifen". Gewiss, der Schein sprach sehr zu Gunsten chemischer Processe, und man vertraute ihm so, dass man den Farbmischungen selbst, und was in ihnen etwa vorging, wenig Beachtung schenkte. Man quälte sich vielleicht oft lange, dem widerspenstigen Gemisch die gewünschten reinen Bilder zu entlocken, aber schliesslich gelang es doch, vielleicht nicht einheitlich über ein ganzes Präparat hinweg, aber doch an einigen Stellen.

Schon die vielen Mischfarben, die entstehen, sind ein Gegenbeweis gegen die chemische Ursache der Chromato-

philie. Wie wenig einheitliche Resultate das Methylgrün-Fuchsin selbst bei gleicher Fixirung verschiedener Objecte gibt, geht wohl am schlagendsten aus einer Arbeit ZIMMERMANN's (II) hervor. Das Gemisch wird desshalb empfohlen, weil es die Chromosomen grün, die Nucleolen roth färbt. Bei Bryonia und Primula fand ZIMMERMANN (II, p. 468) die Chromosomen ebenfalls roth wie die Nucleolen und folgert hieraus mit Recht (II, p. 472), „dass gleichwerthige Zellbestandtheile ein verschiedenes tinctionelles Verhalten zeigen können“. Das Kerngerüst hatte sich nur bei der Hälfte von 28 Pflanzen grün bis blauviolett gefärbt, während bei den übrigen eine „grösstmögliche Verschiedenheit“ (II, p. 470) herrschte. Ueber dasselbe Farbgemisch sagt WENT (I, p. 249): „Es gelingt nicht immer, hiermit eine Doppelfärbung zu erhalten; dieses hängt aber auch viel von der Zusammensetzung der Mischung und von der Dauer der Einwirkung ab.“ Nach GUIGNARD (I, p. 169) muss ein Gemisch aus Fuchsin-Methylgrün für jeden Fall in seiner Zusammensetzung ausprobirt werden, und diese schwankt nach der Natur des Objectes und dem Fixirungsmittel.

Die Klagen über die Unzuverlässigkeit des BIONDI'schen Gemisches sind ebenso zahlreich und bunt, wie die Mischfarben, die es gelegentlich erzeugt. Ueber die Ursachen dieser Launenhaftigkeit wird oft das Absurdeste gefabelt, so behauptet z. B. M. HEIDENHAIN (I, p. 430) ganz ernsthaft, der richtige Säuregrad sei so entscheidend, dass man das Gemisch nicht filtriren dürfe, weil es dadurch an Säure verlieren könne. Wenn wirklich chemische Verwandtschaft die Farbenelection bedingte, dann müsste das Gemisch viel präciser wirken, denn es handelt sich hier doch nicht etwa um eine etwas kleinere oder grössere Verwandtschaft zu zwei Säuren oder Basen, sondern die chemische Theorie nimmt doch an, dass z. B. das Chromatin infolge seiner sauren Natur die Farbbase bevorzuge, umgekehrt das Cytoplasma das Säurefuchsin. Da BIONDI's Gemisch doch alle Farben im Ueberschuss enthält, so kann seine Launenhaftigkeit eben nur darauf beruhen, dass die Farbenelection nicht durch die gröberen Unterschiede der chemischen Verwandtschaft, sondern durch die viel subtileren der mechanischen Affinität entschieden wird.

Die Untersuchung der simultanen Doppelfärbung hat zunächst die primäre und secundäre Acidophobie der Objecte und dann die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Componenten eines Farbengemisches festzustellen. Am geeignetsten sind hierzu die Granulagemische eines einheitlichen chemischen Körpers, wie Platin- oder Chromalbumose (vergl. p. 80—84), deren Adsorptionsvermögen, soweit es chemisch bedingt ist, in kleinen und grossen Granulis ganz gleich sein muss und nur insoweit schwankt, als die grösseren Granula substanzreicher sind als die kleineren, da der Inhalt einer Kugel mit dem Kubus des Radius wächst. Wenn ein solches Granulagemenge aus einem Farbgemisch electiv-chromatophil sich färben liesse, so wäre auch diese Erscheinung der physikalischen Färbung einzuordnen. Um die Farbgemische genauer beurtheilen zu können, hat man sie zunächst in homogene und heterogene einzutheilen. Die homogenen bestehen aus Farbstoffen gleicher chemischer Qualität, also nur aus sauren oder nur aus basischen, die heterogenen aus beiden. Das reine Wasser, das als Lösungsmittel hier stets angenommen

wird, beeinflusst die Färbkraft der einzelnen Componenten einer homogenen Mischung in gleichem Sinne, in den heterogenen aber drückt es die Färbkraft der sauren unter das Optimum herab, während es die der basischen nicht stört. Die Componenten eines heterogenen Gemisches sind also gar nicht äquivalent. Die in der Histologie üblichen Mischungen (Biondi, Ehrlich's Triacid) nehmen auf diese Ungleichheit keine Rücksicht und können daher nur zu einseitigen Resultaten führen. Wenn man die chemische Affinität zweier Körper zu einem dritten prüfen wollte und böte den einen mit ganz entfesselter, den anderen mit theilweise gebundener Kraft dar, so würden die Versuche zweifellos zu Gunsten des unbeschränkt wirkenden ausfallen. Die Wahrheit hätte man damit aber nicht getroffen.

Ausser dieser vom Lösungsmittel abhängigen Ungleichheit der Färbkraft beeinträchtigt auch noch die partielle Fällung der basischen Farbe durch die saure in gewissen Fällen die Tinction aus heterogenen Gemischen. Auch die gebräuchlichen Gemenge des Fuchsines mit einer anderen basischen Farbe, z. B. Methylgrün, enthalten das in Wasser schwer lösliche Fuchsin stets partiell ausgefällt, so dass dieses in viel geringerer Concentration wirkt als der andere Farbstoff, auch wenn gleiche Volumina gleich starker Lösungen vermischt wurden. Das Resultat ist eine Concentrationsfärbung. Endlich ist noch die relative Diffusionsgeschwindigkeit der Componenten zu beachten, die sicher den Ausschlag gibt, wenn das Adsorptionsvermögen des Objectes in allen seinen einzelnen Theilen gleich ist. Aber auch dort, wo schwach acidophobe Gebilde in indifferente eingesprengt sind, wie in der Zelle, ist die Election nicht chemisch wie, Hüppe (I, p. 74) und viele Andere meinen, sondern die Diffusionsgeschwindigkeit entscheidet schliesslich auch hier, wie noch gezeigt werden soll. Alle homogenen Gemische saurer Farben, die sich nicht gegenseitig ausfällen, geben daher sogleich oder secundär reine Diffusionsfärbungen. Das hierher gehörige, von Griesbach (I, p. 366) herrührende Beispiel einer Mischung von Azoblau und Goldorange, das auch Hüppe (I) aufgenommen hat, ist genau so zu erklären, wie die Indulinfärbung der Kerne (p. 139) in Ehrlich's eosinophilem Gemisch, und ist ebensowenig wie diese ein Beweismittel für die chemische Theorie der Färbung.

Neben der primären Adsorption tritt gegenüber dem Farbgemisch besonders auch noch die vom Fixirungsmittel aufgedrückte secundäre hervor. Wurzelspitzen von Vicia mit Sublimat indifferent fixirt, geben mit Biondi's Gemisch oder mit Triacid schematische Bilder: neben den nie fehlenden Mischfarben die meisten Chromosomen und das Gerüstwerk des ruhenden Kernes grün, die Nucleolen und Cytoplasma roth. Wurde aber mit Platinchlorid fixirt und dadurch eine leichte secundäre Acidophobie ertheilt, so sind die Nucleolen theils roth, meist aber grün, und alles Uebrige ist grünlich oder stark violett mischfarben. Man sieht es dem Präparat schon an, dass alle seine Theile den sauren Farben etwas abhold sind. Noch deutlicher antwortet Ehrlich's eosinophile Mischung, in der die Chromosomen und die Kerngerüste, ferner das Cytoplasma des Platinmateriales nicht

einmal einen Hauch des Indulines annehmen und wie die Nucleolen in rothen Tönen gefärbt sind. Ganz anders nach der indifferenten Sublimatfixirung: jetzt sind Kerngerüst und Chromosomen deutlich indulinig gefärbt, die Nucleolen tief eosin, das Cytoplasma dunkel orange.

Man wird daher für solche Gemischfärbungen möglichst indifferente Fixirung vorziehen, und in der That wird ja Sublimat hierfür besonders empfohlen.

Die physikalische Grundlage der simultanen Doppelfärbungen ist auch bereits von einigen anderen Forschern hervorgehoben worden. Besonders hat Raciborski (II, p. 247) ausführlicher sich ausgesprochen. Die Farbenelection der Kerne hängt nach ihm ab: 1) von der Fixirung und Vorbehandlung; 2) Qualität und Quantität der Farbstoffe und Dauer der Behandlung; 3) Qualität des Kernapparates, d. h. Differenzen im Bau. Er hat dann weiter ausgeführt, dass auch die Doppelfärbung mit Jodgrün-Fuchsin keine chemische Reaction, sondern eine Folge verschiedener Oberflächenattraction zu sein scheine (II, p. 248 bis 251).

Ebenso hat Heine (I, p. 504) betont, dass es nur von physikalischen Verhältnissen abhänge, welcher von beiden Farbstoffen aus einem Gemisch von Methylgrün-Safranin aufgenommen werde, und daraus weiter gefolgert, dass man aus solchen Färbungen die chemische Natur der Gewebsbestandtheile nicht bestimmen könne (I, p. 505).

Galeotti bemerkt (I, p. 306), „dass die Färbung gewisser Substanzen durch saures Fuchsin nicht von einer chemischen Verwandtschaft dieser Substanzen mit dem Fuchsin, sondern von deren physikalischem Zustande, ihrer Dicke und Compactheit abhängt“. „Fuchsinophil“ deute keine Wahlverwandtschaft an, sondern sei rein descriptiv.

Eine festere Begründung der physikalischen Theorie der Farbenelection dürfte aber doch erst das Folgende bringen.

1. Die relative Diffusionsgeschwindigkeit der Componenten.

Die Färbung beginnt mit einer Hydrodiffusion der Gemischcomponenten gegen die zu färbenden Objecte und ist insoweit den Gesetzen unterworfen, welche die Physik für die Diffusion von Salzgemengen festgestellt hat. In ihnen diffundiren nach Graham die einzelnen Stoffe „nahezu unabhängig von einander, jeder mit der ihm eigenthümlichen Geschwindigkeit“ (vergl. Ostwald, II, p. 692). Der schnellere wird sogar etwas beschleunigt und drückt den langsameren etwas herab (Winkelmann, I, p. 616, 617), aber doch so wenig, dass die Färbung dadurch nicht beeinflusst werden kann.

Die aus einfachen Salzlösungen in gleicher Zeit herausdiffundirenden Gewichtsmengen sind der Concentration nahezu proportinal (Ostwald, II, p. 674). In Gemengen steigt die Diffusion des concentrirteren Antheiles zwar noch etwas über diese Proportionalität hinaus, aber doch nur so wenig (Ostwald, II, p. 694), dass es für unsere Betrachtung vernachlässigt werden kann.

Man wird daher folgende Regel aufstellen können: Jede Componente eines Farbgemisches diffundirt mit der ihr eigenthümlichen Geschwindigkeit und proportional ihrer

Concentration und tritt in der hierdurch bestimmten Reihenfolge und Gewichtsmenge an das Object heran.

Da in der Litteratur ausser einer Angabe bei Griesbach (I, p. 366) über Azoblau und Goldorange keine allgemeineren Untersuchungen über die relative Diffusionsgeschwindigkeit der Anilinfarben vorlagen, so wurden einige neue Bestimmungen ausgeführt. Griesbach hatte den in der Physik gebräuchlichen Diffusionsapparat benutzt und colorimetrisch die diffundirten Mengen bestimmt. Folgendes sehr einfache Verfahren genügt aber schon, um die relative Diffusionsgeschwindigkeit zu bestimmen. Eine klare, 10-proc. Gelatine, eben noch sauer reagirend wurde, auf Objectträger in annähernd gleich dicker Schicht aufgegossen und erstarrt. Mit einer über einem Glasstab gut kreisrund gebogenen Platinöse wurde ein Tropfen der Farblösung mitten auf die Gelatine gebracht und über einem Millimetermaassstab gemessen. Die Oese aus 0,4 mm dicken Platindraht hatte einen Durchmesser von 4 mm und fasste also, wenn man die schwachen Menisken vernachlässigte, 5 cmm Lösung. Die gleiche Oese wurde stets benutzt und somit auch annähernd die gleiche Menge Farblösung. Der eben aufgelegte, kreisförmige Tropfen mass, mit der Lupe, 5 mm und vergrösserte sich zunächst etwas, gemäss den neuen Adhäsionsverhältnissen. Dann diffundirte nach allen Seiten gleichmässig Farbstoff in die Gelatine und war auf dem Grunde des weissen Maassstabes sehr gut in seinem Fortschreiten zu verfolgen. Die langsam wachsenden Diffusionszonen wurden anfangs alle 10 Minuten gemessen. Das war zu oft und gab zu geringe Ausschläge. Es genügt, wenn alle 2 Stunden gemessen wird. Ganz genau lässt sich der äussere, nur leicht angehauchte Rand der Diffusionsgrenze gegen die vollkommen ungefärbte Gelatine nicht bestimmen, die Messungen haben also nur einen mittleren Werth von Genauigkeit. Es wurden nur noch halbe Millimeter abgelesen, da feinere Schätzungen doch zwecklos gewesen wären. Ferner sei noch bemerkt, dass der ganze Durchmesser der gefärbten Gelatine, also das Diffusionsfeld und der ursprüngliche Tropfen gemessen und in den Zahlen der Tabellen angegeben wurde. Der Fehler war so geringer, als wenn die Diffusionszone allein gemessen worden wäre, weil dann sowohl die verwaschene Grenze zwischen ihr und dem ursprünglichen Tropfen, als auch gegenüber der farblosen Gelatine hätte geschätzt werden müssen. Um die Diffusionszone allein zu erhalten, würde man nur 5 mm von den Zahlen der Tabelle abzuziehen und den Rest zu halbiren haben. Es wird aber für unsere Zwecke vollkommen genügen, wenn wir die Zahlen unverändert als Maassstab der relativen Diffusionsgeschwindigkeit gelten lassen.

Noch auf einige Versuchsbedingungen ist hinzuweisen. Es wurde die ganze Reihe der Farben in jedem Versuche verwendet, um gleiche Temperatur (ca. 20° C), die ja die Diffusion sehr beeinflusst, zu haben. Damit die Gelatine nicht eintrocknete, kamen die Objectträger unter mit Wasser abgesperrte Glocken, aus denen sie nur für die, kaum $^1/_2$ Minute beanspruchenden, Messungen hervorgeholt wurden. Dass die gallertige Consistenz der Gelatine kein Hemmniss für die Diffusion bildet, ist durch Versuche mit Agar bereits physikalisch bewiesen worden (Ostwald, I, p. 687), die Diffusion verläuft wie in reinem Wasser. Vorausgesetzt natürlich, dass der zu prüfende Körper nicht chemisch auf die Gallerte wirkt. Zwei Sorten 10-proc. Gelatine, die eine in ursprünglich schwach saurer Reaction, die andere stark mit Essigsäure versetzt,

wurden verflüssigt und mit den einfachen Farblösungen (0,5-proc.) in Reagensröhren zusammengebracht. Alle die in der Tabelle angeführten basischen und alle sauren, mit Ausnahme der Pikrinsäure und des Eosins, gaben beim Zugiessen keine Trübung der Gelatine, und diese blieb, nachdem sie erstarrt war, auch 48 Stunden vollkommen klar und war in der zugesetzten Farbe schön rein gefärbt. Das Eosin wurde nur in der stark sauren Gelatine zunächst partiell gefällt, später aber fast vollkommen wieder regenerirt. Die Pikrinsäure gibt eine dauernde Fällung der Gelatine nur bei sehr grossem Ueberschuss, der in den Diffusionsversuchen mit 5 cmm Lösung auf ca. 2000 cmm Gelatine natürlich nicht vorkam. Wichtig ist noch die chemische Reaction der Gelatine, die am sachgemässesten neutral sein müsste. Das ist bei der leicht nachsäuernden Gelatine nicht so leicht genau einzuhalten und schliesslich auch nicht nöthig. Das Bequemste ist, eine eben saure Gelatine zu verwenden. Auch schwach alkalische wurde zur Gegenprobe benutzt und ist ja für das säurescheue Eosin gewiss vorzuziehen. Dagegen werden die allein gefärbten sauren Salze der sulfosauren Farbstoffe (Säurefuchsin, Lichtgrün) in die ungefärbten neutralen übergeführt und entziehen sich so der Messung. Dem ist leicht aufzuhelfen, wenn man kurz vor der Messung mit Essigsäuredämpfen die Gelatine leicht ansäuert, die ganze Diffusionszone wird jetzt in schönster Farbe sichtbar. Vortheilhafter ist es aber, unter die Glocken, die zur Aufnahme der sulfosauren und anderer durch Alkalescenz leidender Farben bestimmt sind, ein Uhrschälchen mit einigen Tropfen Essigsäure zu stellen. So wird ein Verbleichen der Farbe auf alle Fälle vermieden. Vollkommen salzfrei braucht die Gelatine nicht zu sein, da physikalisch festgestellt ist, dass ein Salz in die Lösung eines anderen nahezu ebenso schnell diffundirt, wie in reines Wasser (Ostwald, II, p. 675). Kleine Verzögerungen, die vielleicht eintreten könnten, treffen ausserdem alle Farbstoffe gleichmässig und sind daher ohne Einfluss auf das Resultat.

Ausser reiner Gelatine wurden auch noch Zusätze dazu geprüft, einmal um durch die gefärbten Partikelchen die Diffusionsgrenze schärfer hervortreten zu lassen und zweitens um festzustellen, ob durch speichernde Einschlüsse die Diffusion merklich verändert würde. In der folgenden Tabelle diente zu den Versuchen I und II reine, eben saure Gelatine, III hatte einen Zusatz von fein gepulvertem Tabaschir, IV von gut ausgewaschener, flockiger Fällung von Casein mit 1-proc. Platinchlorid, die Gelatine von V enthielt eine Fällung von 40-proc. Deuteroalbumose durch Platinchlorid oder Formaldehyd, und VI eine 5-proc. Deuteroalbumose in Lösung. Die Gelatine war stets 10-proc.

Ausführlich sind nur die Zahlen für eine 4-stündige Diffusion mitgetheilt, um die Schwankungen und damit die Zuverlässigkeit der Messungen zu veranschaulichen. Es folgt dann der Durchschnitt aus den 6 Versuchen für die Diffusion nach 2, 4 und 24 Stunden. Ferner sind die relativen Diffusionsgeschwindigkeiten für diese Zeiten auf Lichtgrün = 1 berechnet, aus denen man ersehen wird, dass die Resultate nach 2, 4 und 24 Stunden recht annähernd überstimmen, und endlich ist hieraus der Durchschnitt gezogen, als Mittelwerth für die Beurtheilung der Diffusionserscheinungen in Farbgemischen.

Tab. I. Relative Diffusionsgeschwindigkeit der Anilinfarben.

Farblösung 0,5-proc. in Wasser	Nach 4-stündiger Diffusion mass der ursprünglich 5 mm breite Tropfen						Durchschnitt aus I.—VI.			Durchschnitt I.—VI. Lichtgrün = 1			Gesammtdurchschnitt
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	2 Std.	4 Std.	24 Std.	2 Std.	4 Std.	24 Std.	
Lichtgrün	7,5	9,5	8,5	9,5	8	11	8	9	13	1	1	1	1
Indulin	7	—	8,5	8	8	9,5	7	8	11	0,9	0,9	0,8	0,9
Säurefuchsin	11	11	11	11	10	12	9	11	19	1,1	1,2	1,5	1,3
Eosin	10	10	12	12	10,5	13	10	11	17	1,3	1,2	1,3	1,3
Pikrinsäure	17	—	17	17	16	18	14	17	33	1,8	1,9	2,5	2,1
Fuchsin	9	12	12	10	10	13	9	11	20	1,1	1,2	1,5	1,3
Safranin	11	12	12	9	10	13	9	11	19	1,1	1,2	1,5	1,3
Methylgrün	8	11,5	11,5	10	9,5	12	9	10	21	1,1	1,1	1,6	1,3
Methylenblau	12	12,5	9	10	9,5	14	10	11	18	1,3	1,2	1,4	1,3

Die Zahlen für die 4-stündige Diffusion schwanken bei jedem Farbstoff in den 6 Versuchen innerhalb 4 mm, nur bei Methylenblau wächst die Differenz zwischen Maximum und Minimum auf 5 mm, bei Säurefuchsin und Pikrinsäure beträgt sie nur 2 mm. Am kräftigsten war die Diffusion in der Gelatine mit 5-proc. gelöster Albumose (VI), und alle Farbstoffe waren hier gleichsinnig beschleunigt. Der Grund dafür dürfte in einer Adsorptionswirkung auf den Farbstoff zu suchen sein. Die Einbettung von farbspeichernden Körperchen, wie Tabaschir (III), Caseinflöckchen (IV), Albumosegranulis (V), hat zwar einige Farbstoffe etwas verlangsamt, bei anderen ist aber nichts davon zu bemerken. Es würde einer viel grösseren Reihe von Versuchen bedürfen, um eine solche Verlangsamung als constant hervortreten zu lassen, und bedarf daher wohl keiner Entschuldigung, wenn sie hier vernachlässigt wird. Für den Zweck der Versuche sind die Zahlen wohl durchweg brauchbar, was sich am besten aus den drei Durchschnitten bezogen auf Lichtgrün = 1 ergeben dürfte. Sie weichen doch nur wenig von einander ab. Besonders stimmen die Werthe für 2 und 4 Stunden recht gut überein. Die relative Diffusionsgeschwindigkeit der vier basischen Farbstoffe erscheint in dem Gesammtdurchschnitt gleich gross und ist auch der von Eosin und Säurefuchsin gleich. Mit dem Lichtgrün stimmt das um weniges langsamere Indulin überein. Allen voraus eilt die Pikrinsäure, die doppelt so schnell wie das Lichtgrün diffundirt. Um ein Bild der wirklichen Geschwindigkeit zu haben, braucht man nur von den Zahlen der Tabelle I die ursprüngliche Grösse (5 mm) des Farbtropfens abzuziehen und den Rest zu halbiren. Man erhält so in Millimeter den Weg, den eine 0,5-proc. Farblösung in 2, 4 und 24 Stunden zurücklegt, natürlich ohne dabei auch die Gewichtsmengen zu haben. Diese Werthe sind in Tabelle II (S. 125) auf 10 Min. umgerechnet und geben nunmehr an, welcher Weg durch Diffusion in 10 Min. zurückgelegt wird.

Die Zahlen nehmen bei allen Farbstoffen gleichmässig ab, was auf die grössere Verdünnung und die Abnahme des Concentrationsgefälles zurückzuführen ist. Sie zeigen ausserdem, dass die winzigen Objecte in der Zelle in 10 Min., ja schon in kürzerer Zeit durchgefärbt sein müssen. Mit den Berechnungen der I. Tabelle (Mittelwerthe) stimmen die Zahlen im Allgemeinen überein, Indulin ist das langsamste, dann kommt Lichtgrün, Säurefuchsin,

Tab. II. Diffusionsstrecke pro 10 Minuten in 2, 4 und 24 Stunden.

Farblösung 0,5-proc.	2 Std. mm	4 Std. mm	24 Std. mm
Lichtgrün	0,125	0,08	0,03
Indulin	0,08	0,06	0,02
Säurefuchsin	0,17	0,125	0,05
Eosin	0,208	0,125	0,05
Pikrinsäure	0,38	0,25	0,1
Fuchsin	0,17	0,125	0,05
Safranin	0,17	0,125	0,05
Methylgrün	0,17	0,104	0,055
Methylenblau	0,208	0,125	0,045

Eosin, Pikrinsäure. Nur diffundirt das Eosin in den ersten beiden Stunden entschieden schneller als das Säurefuchsin, später gleicht sich das aus. Ebenso eilt anfangs das Methylenblau den anderen basischen Farben etwas voraus.

Für 2-proc. Lösungen würde sich entsprechend der sehr geringen Beschleunigung auch eine sehr geringe Zunahme der Zehnminutenstrecken ergeben. Für Lichtgrün und Eosin wäre sie in den ersten 2 Stunden = 0, für Säurefuchsin 0,06 mm. Da eine 2-proc. Eosinlösung einen Mittelwerth von 1,4, eine 0,5-proc. einen von 1,3 für die relative Diffusionsgeschwindigkeit ergab, so ist dieser Einfluss der Concentration fernerhin zu vernachlässigen, vorausgesetzt dass die Concentrationsunterschiede nicht sehr gross werden.

Einige Versuche von Gemischen bringt Tabelle III, deren fast vollkommene Uebereinstimmung mit Tabelle I nur der Erwähnung bedarf.

Tab. III. Diffusion in Gemischen.

Farbmischung				4 Std.	24 Std.	0,5 Lichtgrün = 1 4 Std.	 24 Std.	Mittelwerth
1) Pikrinsäure	0,5-proc.	1 ccm		16	30	1,6	2,1	1,9
Lichtgrün	0,5 „	4 „		10	14	1	1	1
2) Pikrinsäure	0,5 „	1 „		15	30	1,5	2,1	1,8
Lichtgrün	0,5 „	8 „		9,5	14	1	1	1
3) Pikrinsäure	0,5 „	1 „		15	30	1,5	2,1	1,8
Indulin	0,5 „	4 „		7,5	10	0,8	0,7	0,8
4) Pikrinsäure	0,5 „	1 „		16	30	1,6	2,1	1,8
Säurefuchsin	0,5 „	4 „		11	17	1,1	1,2	1,2
5) Pikrinsäure	0,5 „	1 „		16	30	1,6	2,1	1,9
Eosin	0,5 „	4 „		10,5	14,5	1,1	1,0	1,1
6) Säurefuchsin	2 „	1 „		12	17	1,2	1,2	1,2
Lichtgrün	2 „	4 „		10,5	15	1,1	1,1	1,1
7) EHRLICH's eosinophile Lösung	Aurantia, Eosin,		gelbroth	12	21	1,2	1,5	1,4
	Indulin,		schwärzlich	8	12	0,8	0,9	0,9
8) EHRLICH's Triacidlösung	Orange-Säurefuchsin		gelbroth	15,5	26	1,6	1,9	1,8
	Methylgrün,		schwarzgrün	11	18,5	1,1	1,3	1,2

2. Die Concentration der Componenten.

Die besonders beliebten Farbmischungen Ehrlich's, ferner Biondi's Dreifarbengemisch sind nach bestimmten Recepten quantitativ zusammengesetzt und geben an den Objecten, für die sie durch Probiren eingestellt sind, auch gute elective Färbungen. Auch andere Farbmischungen, z. B. Jodgrün-Fuchsin nach A. Zimmermann (I, p. 5; IV, p. 464) müssen die Componenten in einem bestimmten Verhältniss enthalten, damit sie zuverlässig doppelt färben. Ihre relative Concentration ist daher gar nicht so gleichgiltig, wie Auerbach (III, p. 716) für die chromatophilen Färbungen der Sexualkerne voraussetzt. Er hat übersehen, dass er mit einer beliebigen Mischung, die in einem Falle eine gute Erythrophilie und Cyanophilie hervortreten liess, an anderen Objecten keine reinen Differenzen erhalten konnte. Es musste (III, p. 716) zuweilen von der einen Farblösung noch ein Schuss zugegeben werden. Von diesem Schuss mehr oder weniger, der bald als nothwendig, bald als gleichgiltig für die Doppelfärbung erklärt wird, wird überhaupt in der Literatur viel geredet. Die meisten erkennen aus dem beliebigen Schuss, dass genaue Mischungsverhältnisse nicht erforderlich sind. Um die Unsicherheit der Anschauungen zu beseitigen, bedarf es noch einer genauen Untersuchung über die relative Concentration der Gemischcomponenten. Wenn man von zwei beliebigen Farbstoffen gleiche Mengen gleich starker Lösungen zusammengiesst, so wird man nur dann Gemische mit gleicher Concentration der Componenten erhalten, wenn kein Niederschlag entsteht, die Mischung klar bleibt. Das ist aber selten. In homogener Mischung bleiben saure Farben klar, einige Ausnahmen, wie Pikrinsäure-Eosin, wo letzteres partiell bei gewisser Concentration der ersteren gefällt wird, kommen vor. Die basischen Farbstoffe, homogen gemischt, verhalten sich viel ungleicher, was zum guten Theil auf ihre ungleiche Löslichkeit in Wasser zurückzuführen ist. Gerade das bei Mischungen so bevorzugte Fuchsin ist in kaltem Wasser schwer löslich und fällt aus einer heiss bereiteten stärkeren Lösung langsam wieder aus. Wird nun eine sog. wässrige concentrirte Lösung von Fuchsin, die noch weniger als 0,1 Proc. enthält, mit einem leichter löslichen basischen Farbstoff zusammengeschüttet, so fällt immer ein Theil des Fuchsines in rothen Flöckchen und Flitterchen aus. Die trüb-mischfarbige Lösung enthält also weniger Fuchsin, als dem zugesetzten Volum entspricht. Es stellt sich eine neue relative Concentration zwischen Fuchsin und z. B. Methylgrün oder Methylenblau her, und sie entscheidet über die Doppelfärbung. Ferner ist zu bedenken, dass auch chemische Wechselwirkungen zu einer partiellen Fällung einer oder beider Componenten führen können, kurz man wird stets darauf zu achten haben, dass auch in homogenen Gemischen basischer Farben die endgiltige Concentration anders ist, als die volumetrische Zusammensetzung aus den reinen, klaren Farblösungen angibt. Fuchsin war stets reichlich ausgefällt in Mischungen gleicher Theile mit Methylgrün, Methylenblau. Hier dominirte also, trotz gleicher procentischer Zusammensetzung, in der endgiltigen Lösung stets der blaue Farbton. Ebenso verhält sich eine Mischung von Safranin-Methylenblau, während in Safranin-Gentiana das letztere theilweise ausgefällt wird.

Stets gibt es starke Fällungen in heterogenen Gemischen, und zwar ist immer der basische Farbstoff mehr oder weniger in der Lösung des sauren unlöslich, auch chemische Niederschläge sind zu berücksichtigen. In Mischungen von Säurefuchsin und Methylenblau oder Methylgrün war stets der basische Antheil reichlich gefällt, ebenso Fuchsin, Safranin, Methylviolett in Mischungen mit Lichtgrün und ebenso in Mischungen mit Pikrinsäure. Der Grad der Ausfällung ist ein verschiedener, und daher sind die Concentrationen derselben basischen Farbstoffe in Gemischen mit verschieden sauren Farben recht verschieden. In Biondi's Gemisch und in Ehrlich's Triacidlösung schwimmen reichliche Flocken des gefällten Methylgrüns. Ehrlich (II, p. 47, 127) hat bereits darauf aufmerksam gemacht, dass beim Vermischen von Säurefuchsin mit Methylgrün die Säure des ersteren mit der Base des letzteren zu einem neuen, „neutralen" Farbsalz sich vereinigt, dessen beide Bestandtheile Chromatophoren sind, durch deren Vereinigung eine Mischfarbe, z. B. in der Triacidlösung das Violett der „neutrophilen" Körnung entstehen muss. Im Allgemeinen lassen sich die durch partielle Fällung, oder durch theilweise chemische Bindung entstehenden Verschiebungen der relativen Concentration der einzelnen Componenten heterogener Gemische nicht behandeln. Ich verweise auf die speciellere Besprechung der Dreifarbengemische.

Tropft man etwas Mischung auf Fliesspapier, so findet ja bekanntlich eine capillare Trennung der Componenten statt, und man wird stets deutlich erkennen, wenn eine davon partiell ausgefällt war. Sie bleibt im Centrum als flockiger Niederschlag zurück, um den sich der homogene, gleichmässige Saum der Capillardiffusion der wirklich gelösten Antheile ausbreitet. Ist alles gelöst, so gibt es nur solche homogen gleichmässig gefärbte Zonen. Ueber die relative Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser geben solche Fliesspapierversuche keinen vollen Aufschluss, die Farbringe, die entstehen z. B. von Biondi's Lösung, ein grünes, etwas fleckiges Centrum, denen zunächst eine rein rothe Zone und dann eine orangegelbe folgt: diese Farbringe sind gemischten Ursprunges. Besonders die basischen Farben werden durch die Capillarkräfte des Fliesspapiers theilweise zurückgehalten, während das Wasser vorauseilt. Die leichter löslichen sauren Farben folgen ihm schneller. Daher bekommt man aus annähernd gleichen Tropfen saurer und basischer Farben auf Fliesspapier ganz verschiedene Diffusionsbilder. Die sauren färben das Fliesspapier gleichmässig, soweit es überhaupt vom vordringenden Wasser benetzt ist, bei den basischen aber umgibt eine breite ungefärbte Zone, in die nur das Wasser vorgedrungen ist, das gefärbte Centrum mit den zurückgehaltenen Farbstoffen (Taf., Fig. 31—34). Einige Beispiele mögen das zeigen; in der Tabelle (S. 128) sind die beobachteten Werthe auch auf Lichtgrün = 1 umgerechnet.

Hätte man die Capillardiffusion an verticalen Fliesspapierstreifen sich abspielen lassen, so würden ganz die gleichen Erscheinungen zu beobachten sein. Erstens steigen alle sauren mit dem Wasser empor, unbeachtet, ob roth oder grün oder blau, während die basischen Farben wieder alle durch Capillarattraction zurückgehalten werden. Auch in heterogenen Gemischen

Capillardiffusion auf Fliesspapier.
(Durchmesser in Millimeter.)

0,1-proz.	Beobachtet		Berechnet auf Lichtgrün = 1		Gemische	
	ganze Diffusionszone	gefärbter Theil	ganze Zone	gefärbte Zone	roth	blau oder grün
1) Säurefuchsin, Taf., Fig. 32	28	28	1	1		
2) Lichtgrün Taf., Fig. 34	30	30	1	1		
3) Methylgrün Taf., Fig. 33	36	20	1	0,55		
4) Fuchsin Taf., Fig. 31	36	16	1	0,42		
5) Methylenblau	33	15	1	0,45		
			rother Antheil	blauer oder grüner		
6) Lichtgrün + Säurefuchsin	33	33	1	1	33	33
7) Lichtgrün + Fuchsin	27	27	0,52	1	14	27
8) Säurefuchsin + Methylgrün	29	29	1	0,5	29	15
9) Säurefuchsin + Methylenblau	26	26	1	0,5	26	13

(No. 7—9 der Tabelle) bleibt stets, gleichviel ob blau oder roth, der basische Antheil zurück, nicht etwa bloss desshalb, weil er partiell ausgefällt ist, sondern weil er weniger löslich in Wasser ist und daher leichter capillar festgehalten werden kann. Die sauren Farben, gleichviel ob roth oder grün, diffundiren in heterogenen Gemischen genau wie in der reinen Lösung ungeschwächt mit dem Wasser. Näher auf diese Versuche, über die noch mancherlei zu sagen wäre, will ich nicht eingehen. Sie waren nothwendig, weil R. Hertwig (I, p. 111), der Auerbach's Gemische in Fliesspapier emporsteigen liess und immer den rothen Farbstoff vorauseilen sah, hierin einen physikalischen Unterschied der rothen Reihe gegenüber der blauen erblickt. Das ist nicht richtig, Hertwig hat wohl zufällig lauter Gemische gehabt, in denen die rothe Componente sauer war (Säurefuchsin, Eosin). Die Farbe ist bei diesen Versuchen ganz gleichgiltig, es entscheidet die Löslichkeit in Wasser, die für alle sauren Farben grösser ist als für basische. Bei diesen ist sie ungleich, was auch auch in der Tabelle (No. 3—5) deutlich hervortritt, am löslichsten ist das Methylgrün.

In allen Farbgemischen, die gebräuchlich sind oder zu speciellen Zwecken hergestellt werden, herrscht also eine ungleiche Concentration der Componenten. Dadurch wird, falls die Concentrationsdifferenzen sehr grosse sind, auch die Diffusionsgeschwindigkeit der Componenten beeinflusst. Steigt das Verhältniss vielleicht auf 1 : 100 oder noch höher, so wird selbst bei gleicher relativer Diffusionsgeschwindigkeit der stark verdünnte Farbstoff hinter dem anderen beträchtlich zurückbleiben. In homogen basischen Gemischen wird eine solche Verschiebung stets zu erwarten sein, schon geringe Differenzen in der Diffusion würden zur Doppelfärbung ausreichen. Ist die relative Diffusionsgeschwindigkeit von Haus aus eine sehr ungleiche, z. B. Pikrinsäure und Säurefuchsin, so wird eine starke Verdünnung des schnelleren sich ebensowenig bemerklich machen, wie eine hohe Verstärkung des langsameren. In heterogenen Gemischen wird stets durch

starke Ausfällung die Concentration des basischen Antheiles herabgedrückt. Da Säurefuchsin und Eosin mit Vorliebe zur heterogenen Mischung verwendet werden und ungefähr dieselbe relative Diffusionsgeschwindigkeit haben, wie die basischen (p. 124), so muss deren Ausfällung hier besonders beachtet werden. Denn sie kann die Diffusion des basischen so herabdrücken, dass er erst nach dem sauren an die färbbaren Objecte herantritt.

Eine zweite Wirkung der ungleichen Concentration der Componenten folgt daraus, dass die diffundirenden Mengen proportional der Concentration wachsen resp. abnehmen. In homogenen basischen Gemischen wird stets der ganz gelöste concentrirtere Antheil also nicht bloss schneller diffundiren als der andere, sondern es werden auch mehr Farbmengen in der Zeiteinheit an die Objecte herantreten. Die Färbung mit dem zuerst kommenden Farbstoff muss also viel intensiver ausfallen, als sie der folgende zweite je bewirken könnte. Wenn also gewisse Zellelemente mit dem concentrirteren ersten bereits sich vollgespeichert haben, so würde der zweite, auch wenn er nebenbei noch aufgenommen würde, die intensive Farbe des ersten doch nicht decken können. Es gibt höchstens einen leichten Stich davon.

Anders kann bei ungleicher Concentration in homogen sauren Gemischen die Färbung verlaufen. Der verdünnte, aber viel schnellere Farbstoff kommt zwar zuerst, aber vermag infolge seiner Verdünnung nur schwach zu färben. Nun folgt der zweite Farbstoff mit einer seiner hohen Concentration proportionalen Menge und kann durch sie die erste schwache Färbung ganz zudecken.

In heterogenen Gemischen überwiegen, wenn gleiche Theile gleich starker Lösungen vereinigt werden, die sauren Farben so, dass sie entsprechend ihrer schnelleren Diffusion und der stärkeren Concentration sehr intensiv färben würden, bevor der basische Antheil nachfolgt. Nur leiden die heterogenen Gemische an einem Fehler, durch den die reinen Wirkungen der Concentrationsdifferenzen ganz verdeckt werden können, nämlich daran, dass (p. 120) die Farben nicht mit gleich optimaler Färbekraft concurriren können, die sauren sind trotz hoher Concentration im Nachtheil.

Nach alledem verdient also die relative und absolute Concentration der Componenten die allergrösste Beachtung, da sie neben der relativen Diffusionsgeschwindigkeit die ganze Doppelfärbung rein physikalisch erklärt, wie nunmehr noch an einer Reihe von Beispielen gezeigt werden soll.

3. Homogene Gemische saurer Farben.

Diese Gemische sind desshalb von fundamentaler Bedeutung für die Färbungstheorie, weil sie klar bleiben und das volumetrisch abgemessene Verhältniss der Componenten durch keine Fällung beim Vereinigen geändert wird, endlich die färbenden Antheile gleichen chemischen Charakter haben und sich also nicht stören. Die Versuche haben nach den theoretischen Betrachtungen der vorausgehenden Absätze Folgendes zu berücksichtigen:

1) die relative Diffusionsgeschwindigkeit der Componenten,
2) ihre relative und ihre absolute Concentration.

Dazu kommt noch die verschiedene Deckkraft, über die erst bei den Versuchen selbst einiges sich herausstellen wird.

Nucleinsäuregranula waren nicht zu brauchen (p. 95), sehr vortheilhaft erwies sich eine Fällung von 40-proc. Deuteroalbumose mit 2,5-proc. Kaliumbichromat, die zur Heranzüchtung schöner Granulagemische nach dem Recept von p. 38 hergestellt worden war. Sie bildet das Testobject für alle Versuche mit Gemischen saurer Farben, während die Albumosefällung mit (1 + 10) $PtCl_4$ als Testobject für Methylgrün-Fuchsin und ähnliche basische Gemische verwendet wurde. Infolge ihrer leichten Acidophobie ist die Platinalbumose für die folgenden Gemische nicht recht geeignet. Wenn man aber die Färbezeit auf 1 Stunde und mehr verlängert, erhält man auch schöne Doppelfärbungen.

Das Testobject (Albumosechromat) bestand aus einem bunten Gemenge von Granulis aller Grössen, von denen die grössten und die kleinsten in reinen Doppelfärbungen aus geeigneten Gemischen hervorgingen, während die Zwischenstufen in allen Mischfarben schillerten, die jedem, der an natürlichen Objecten simultane Doppelfärbungen zu erhaschen suchte, hinreichend bekannt sind. Regellos waren diese Mischfarben aber nicht nuancirt, sondern die grösseren Granula neigten mehr zur reinen Farbe der grossen, die kleineren zu der der kleinen. In den folgenden Beschreibungen sind nur die reinen Färbungen berücksichtigt, da sie allein genügen, um das ganze Problem der Farbenelection aufzuklären.

Auch die p. 31 geschilderte Spiegelfärbung der grösseren Granula tritt schön hervor (Taf., Fig. 12—15). Der Spiegel ist in der schneller diffundirenden Farbe gefärbt, die Schale entweder mischfarbig oder bei optimalen Mischungsverhältnissen ebenso rein wie die kleinen Granula in der langsameren Farbe.

1. Mischungen mit Pikrinsäure.

1) Pikrinsäure-Säurefuchsin. Um die bekannte Altmann-sche Granulafärbung vollkommen umzukehren (Taf., Fig. 11 und 12), bedarf es, wie schon p. 109 erwähnt, nur einer geeigneten Mischung aus Pikrinsäure-Säurefuchsin, die auch durch die grossen Unterschiede in der relativen Diffusionsgeschwindigkeit ihrer Componenten ein besonderes Interesse beansprucht. In der folgenden Tabelle I (S. 131) ist die relative und die absolute Concentration angegeben und der Färbungserfolg an den grossen und kleinen Granulis. Gelb bedeutet, dass keine Beimischung von Säurefuchsin wahrzunehmen war, Orange einen starken, Goldgelb einen schwachen rothen Stich, Roth reine Fuchsinfarbe. Total Gelb bei den grossen Granulis zeigt an, dass Vollfärbung eingetreten war, Spiegelfärbung ist besonders erwähnt.

Die Wirkung der relativen Diffusionsgeschwindigkeit tritt in allen Versuchen klar hervor, in allen beherrscht das Uebergewicht der schnelleren Pikrinsäure den Färbungserfolg. Selbst in No. 1, mit 8 mal so viel Säurefuchsin, sind doch die grossen Granula noch tief orange gefärbt, d. h. die Hauptfärbung stammt von der Pikrinsäure, die Nuance wird durch übergelagertes Säurefuchsin bestimmt. Sollte dieses das Gelb ganz vernichten, so hätte man noch viel mehr Roth nehmen müssen. Bei

Tabelle I. Pikrinsäure-Säurefuchsin.

Relative Diffusionsgeschwindigkeit: Pikrinsäure 1,6, Säurefuchsin 1.
Färbezeit 6 Minuten, kurze Wasserspülung, Trocknen, Balsam.
Testobject: Albumosechromat.

No.	Relative Concentration		Absolute Concentration		Testobject	
	Pikrinsäure	Säurefuchsin	Pikrinsäure	Säurefuchsin	grosse Granula	kleine Granula
			Proc.	Proc.		
1	1	8	0,055	0,44	tief organge	roth
2	1	4	0,1	0,4	orange	„
3	1	2,5	0,14	0,36	Spiegel tief goldgelb, Rand roth	„
4	1	2	0,17	0,33	Spiegel gelb, Rand roth	„
5	1	1,25	0,22	0,28	Spiegel gelb, Rand leicht roth	„
6	1	1	0,25	0,25	total gelb, Rand oft roth gehaucht	roth, oft gelber Spiegel
7	1	1	0,05	0,05	Spiegel gelb, rother Rand	roth
8	1	0,75	0,29	0,21	total gelb	roth, oft gelber Spiegel
9	1	0,5	0,33	0,17	desgl.	schwach roth, gelber Spiegel
10	1	0,5	0,125	0,0625	goldgelb	roth (intensiv)
11	1	0,5	0,1	0,05	Spiegel gelb, Rand roth	desgl.
12	1	0,25	0,4	0,1	total gelb	schwach roth, gelbe Spiegel
13 (Taf., Fig. 12)	1	0,25	0,13	0,03	total gelb oder mit rothem Rand	roth
14	1	0,25	0,08	0,02	desgl.	desgl.
15	1	0,17	0,15	0,025	total gelb und auch viele mittlere rein gelb	nur die kleinsten noch roth, alle anderen gelb

gleicher relativer Concentration der Pikrinsäure sinkt mit abnehmender Concentration des Säurefuchsins auch dessen Wirkung auf die grossen Granula. Zunächst wird ihr Orange etwas gelber (2), dann ist nur noch der Rand von Roth nuancirt (Taf., Fig. 12), während der Spiegel mehr und mehr rein Gelb zustrebt (3—4). Eine weitere Abnahme des Roth äussert sich in der immer schwächeren Rothfärbung des Randes (5 und 6), endlich sind die grossen Granula rein gelb (8, 9, 12). Nunmehr sinkt auch das intensive Roth der kleinen Granula der No. 1—5 auf schwächere Töne zurück, und es erscheinen sehr oft gelbe Spiegel (No. 6, 8, 9, 12), wie in den grossen. Beim äussersten Extrem endlich (No. 15) sind nur noch die allerkleinsten roth gefärbt, alle anderen Granula sind rein gelb.

Man sieht, dass es vollkommen unmöglich ist, aus irgend einer Mischung von Pikrinsäure-Säurefuchsin die grossen Granula roth und die kleinen gelb zu färben; würde man noch mehr Roth, wie bei No. 1, zusetzen, dann würde alles total roth sich färben. Von diesem, ebenfalls zu keiner Fuchsinophilie der grossen Granula führenden Extrem abgesehen, besteht also dem Gemisch gegenüber eine ausgesprochene Pikrinophilie der

grossen Granula, derselben, die sich bei succedaner Doppelfärbung nach Altmann mit der gleichen Hartnäckigkeit fuchsinophil färben (p. 109; Taf., Fig. 11 und 12). Die Pikrinophilie ist nur eine Folge der grösseren Diffusionsgeschwindigkeit der Pikrinsäure, die stets dem Säurefuchsin vorauseilt und von den substanzreicheren grossen Granulis so intensiv gespeichert wird, dass das Roth nicht überfärben kann. Chemisch abgesperrt durch die Pikrinsäure ist das Roth keineswegs, wie die Orangefärbung bei No. 1 und 2 erkennen lässt.

Dass der von der Pikrinsäure besetzte Platz nicht vom nachfolgenden Roth eingenommen wird, beruht auf der absoluten Concentration. Man vergleiche zunächst die No. 6 und 7 mit gleicher relativer Concentration der Componenten, in 7 aber in fünffacher Verdünnung von 6. Hier sind die grossen Granula total gelb, ihr Rand ist oft leicht roth angehaucht, die kleinen Granula leuchten oft mit gelbem Spiegel. Anders in No. 7, hier hat das Roth die kleinen Granula intensiv gefärbt, und ebenso ist der Rand der grossen meist kräftig roth. Die stärker verdünnte Pikrinsäure eilt (7) immer noch voraus, sie bringt aber proportional ihrer geringeren Concentration nur geringere Mengen an die Granula heran. Diese können also, bevor das Roth kommt, sich nicht so vollkommen mit Gelb beladen, wie in Versuch 6. Die mechanischen Affinitäten sind nicht ganz durch die Pikrinsäure gesättigt und ziehen nun das Säurefuchsin herbei.

Auch die No. 9—11 veranschaulichen für die relative Concentration 1 : 0,5 die grössere Reinheit der Doppelfärbung bei fallender absoluter Concentration, ebenso No. 12—14 für das Verhältniss 1 : 0,25. Sind die grossen Granula total gelb gefärbt, dann ist die absolute Concentration der Pikrinsäure noch zu hoch (9, 12), und daher werden auch die kleinen nicht intensiv roth. Sobald aber der Rand der grössten Granula sich leicht röthet (13), dann nähert sich die absolute Concentration dem Optimum für die Doppelfärbung. Dieses ist erreicht, wenn der Rand schön roth, der Spiegel rein gelb und die kleinen Granula intensiv roth gefärbt sind (No. 7, 11, 13, 14). Zu jedem Mischungsverhältniss gehört ein besonderes Optimum der absoluten Concentration der Pikrinsäure. Im Allgemeinen wird man 0,1-proc. Pikrinsäure als dieses Optimum für Mischungen mit 0,25 — 2 Säurefuchsin auf 1 Pikrinsäure ansehen dürfen. Bei optimaler Doppelfärbung sind die mittelgrossen Granula, deren Schale sich nicht mehr roth gefärbt hat, rein gelb. Die schwach acidophobe Platinalbumose färbte sich in 1 Stunde sehr schön chromatophil aus einer Mischung von 1 Pikrinsäure auf 0,375 Säurefuchsin (absolute Concentration 0,13 und 0,05). Altmann's Granulafärbung war vollkommen umgekehrt, wiederum mit schönster Spiegeldifferenzirung.

2) Pikrinsäure-Lichtgrün durfte, wie die vorige Mischung, nur die grossen Granula gelb, die kleinen grün, nicht umgekehrt färben, weil das Lichtgrün bedeutend langsamer als die Pikrinsäure diffundirt. Eine ganz reine Lichtgrünfärbung der kleinen Granula darf man hier nur bei sehr geringer absoluter Concentration der Pikrinsäure erwarten, weil deren gelbe Farbe leichter von Roth als von Grün ausgelöscht oder gedeckt werden kann. Die Doppelfärbung ist schon als gelungen anzusehen und imponirt auch so, wenn die grossen Granula rein gelb,

die kleinen stark grün, aber mit Stich ins Gelb gefärbt sind. Einzelne Stellen des Präparates, besonders der Rand, werden dann auch rein lichtgrüne Färbung darbieten (Taf., Fig. 13).

Tabelle II. Pikrinsäure-Lichtgrün.

Relative Diffusionsgeschwindigkeit: Pikrinsäure 2,1, Lichtgrün 1.
Färbezeit 6 Minuten, weitere Behandlung und Testobject wie Tabelle I.

No.	Relative Concentration		Absolute Concentration		Testobject	
	Pikrinsäure	Lichtgrün	Pikrinsäure	Lichtgrün	grosse Granula	kleine Granula
1	1	16	0,03	0,47	alle grün	alle grün
2 (Taf., Fig. 13)	1	12	0,038	0,46	gelb mit grünem Rand und oft grün verdeckt	grün
3	1	8	0,055	0,445	rein gelb	grün, oft gelbe Spiegel
4	1	4	0,1	0,4	desgl.	grün, oft gelbe Spiegel
5	1	0,25	0,4	0,1	desgl.	grün, aber grell gelbgrün
6	1	0,25	0,13	0,03	desgl.	grell grün
7	1	0,25	0,08	0,02	desgl.	grell grün, auch rein grün

Die grossen Granula werden, wie vorauszusehen war, stets gelb, und erst bei hohem, 16-fachem Ueberschuss des Lichtgrünes ist schliesslich alles grün gefärbt. Ein nahezu optimales Verhältniss ist in No. 2 getroffen (Taf., Fig. 13). Die No. 3 und 4 entsprechen der No. 1 und 2 der Tabelle I in absoluter und relativer Concentration der Componenten. Ein Vergleich wird lehren, dass das Säurefuchsin mächtiger ist als das ebenso concentrirte Lichtgrün, denn dort (Tab. I, No. 1, 2) sind die grossen Granula orange gefärbt, also mit Stich von Roth, während Tabelle II (No. 3 und 4) durch deren rein gelbe Färbung und die gelben Spiegel in den kleinen Granulis die Ohnmacht des Lichtgrünes veranschaulicht. Ebenso leicht würde man sich aus No. 5—7, Tab. II, und No. 12—14, Tab. I, von der geringeren Leistung des Grünes und der grösseren des Säurefuchsines bei gleicher absoluter und relativer Concentration überzeugen können.

Die Schwäche des Lichtgrünes ist einmal auf seine geringere Diffusionsgeschwindigkeit und zweitens auf seine geringere Deckkraft für Gelb zurückzuführen. Desshalb würde bei genauerer Bestimmung das Optimum für die absolute Concentration der Pikrinsäure jedenfalls noch unter 0,1 herabsinken. Platinalbumose gab schönste Chromatophilie mit Mischung No. 6 (Tab. II) in 1 Stunde, grosse Granula gelb, kleine grün.

3) Pikrinsäure mit Indulin oder Nigrosin kann infolge der langsamen Diffusion dieser Induline immer nur wiederum die grossen Granula gelb, die kleinen schwärzlich-stahlblau, nie umgekehrt färben. Unser Testobject gab bei Vermischung von 0,1 Lösungen sehr schöne Doppelfärbung bei der relativen Concentration 1 Pikrinsäure zu 3 Nigrosin, resp. Indulin. Im Verhältniss 1 : 0,25 färbte die Mischung zwar die grossen Granula rein gelb, aber das Nigrosin konnte

die Pikrinsäure in den kleinen Granulis nicht ganz überdecken, sie wurden nur schmutzig rauchgrau-gelb. Alles in allem keine Abweichung von den in No. 1 und 2 festgestellten Grundsätzen.

4) Pikrinsäure-Eosin schliesst sich den vorausgehenden Mischungen durchaus an, nur ist stets mit einer partiellen Ausfällung des Tetrabromfluorescines zu rechnen, die zwar so gering sein kann, dass die Mischung klar bleibt, die aber die Ueberfärbung der adsorbirten Pikrinsäure durch das Eosin beeinträchtigen kann. Zum Theil könnte eine solche Hemmung wieder durch die grosse Deckkraft der Eosinfarbe für Gelb ausgeglichen werden. Dass auch diese Mischung nicht dazu zu bringen ist, die grossen Granula roth und die kleinen gelb zu färben, bedarf wohl nach Früherem keines erneuten Beweises. Eine annähernd optimale Doppelfärbung gibt das Verhältniss 1 : 0,75, mit 0,08-proc. Pikrinsäure und 0,06-proc. Eosin.

2. Mischungen mit Säurefuchsin.

Rothfärbung der grossen Granula unseres Testobjectes wird Säurefuchsin nur im Gemenge mit solchen sauren Farben geben, die eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit haben, also mit Lichtgrün, Indulin und Nigrosin. Die Concurrenz mit Eosin lässt sich nicht gut ausprobiren. Dagegen verschaffen uns die Gemische mit Lichtgrün etc. die Freude, dieselben Granula, die im Pikrinsäure-Fuchsingemisch sich pikrinophil und nicht fuchsinophil färbten, nunmehr im schönsten Roth bewundern zu können (Taf., Fig. 14).

1) Säurefuchsin-Lichtgrün, klare, bläuliche Gemische. Besser als das Gelb der Pikrinsäure deckt das Lichtgrün das Roth des Säurefuchsines, und daher ist es hier auch leicht, die kleinen Granula in rein grünen Tönen zu färben. Die blaugrünen Mischfarben sind auch bereits vom reinen, feurigen Roth der grossen Granula so verschieden, dass das Bild einer vollendeten Doppelfärbung entsteht. Es lassen sich gewissermaassen zwei Optima für die Mischung unterscheiden, das eine gibt rein grüne Färbung der kleinen Granula, das andere die schön blaugrüne Mischfarbe. Diese weicht nicht wieder, wenn das Verhältniss 1:1 erreicht ist, weshalb geringere Concentrationen des Lichtgrünes nicht untersucht zu werden brauchten. (Tab. III S. 135.)

Die No. 8—10 bringen neue Belege dafür, dass von der absoluten Concentration des schneller diffundirenden Antheiles die Doppelfärbung wesentlich abhängt. Diffundiren zu grosse Mengen (No. 8), so werden bereits alle mechanischen Affinitäten von dem Säurefuchsin gesättigt, und das nachfolgende Grün findet den Platz bereits vollständig besetzt (No. 8) oder doch nur so wenig noch frei, dass Mischfarbe entstehen kann. In den No. 3—7 ist durchweg die Concentration des Säurefuchsines zu hoch, ebenso beinahe noch in No. 1. Ungefähr das Optimum ist in No. 2 bei gleichem Mischungsverhältniss wie in No. 1 erreicht (Taf., Fig. 14). Um die Platinalbumose recht intensiv zu färben, empfiehlt sich eine Mischung von 1 Säurefuchsin und 8 Lichtgrün, in der absoluten Concentration 0,22 und 1,78, also sehr farbenstark, 4mal so stark als No. 3 der Tabelle. In 1 Stunde wird die Abneigung gegen die

Tabelle III. Säurefuchsin-Lichtgrün.

Relative Diffusionsgeschwindigkeit: Säurefuchsin 1,3, Lichtgrün 1. Alles andere wie bei Tabelle I.

No.	Relative Concentration		Absolute Concentration		Testobject	
	Säure-fuchsin	Licht-grün	Säure-fuchsin	Licht-grün	grosse Granula	kleine Granula
1	1	15	0,033	0,47	roth, mit blaugrünem Rand	rein grün, auch blaugrün
2 (Taf., Fig. 14)	1	15	0,017	0,25	roth, Rand rein grün	rein grün
3	1	8	0,056	0,44	roth, mit blaugrünem Rand	meist blaugrün, selten rein grün
4	1	8	0,033	0,27	desgl.	blaugrün
5	1	4	0,1	0,4	tief roth	„
6	1	3	0,125	0,375	desgl.	„
7	1	2	0,17	0,33	desgl.	„
8	1	1	0,25	0,25	desgl.	tief roth
9	1	1	0,05	0,05	roth, mit blaugrünem Rand	blaugrün
10	1	1	0,05	0,05	desgl.	„

saure Farbe vollkommen überwunden, die grossen Granula sind tief roth gefärbt, die übrigen in allen Abstufungen durch die blaugrünen Mischfarben bis herab zu den rein lichtgrünen kleinen.

2) Säurefuchsin-Indulin (Nigrosin), klare, dunkelviolette Mischung von ähnlichem Verhalten wie die vorige. Das Optimum liegt bei No. 1 der folgenden Tabelle und ein zweites bei No. 4, das im Vergleich zu No. 3 durch die geringere absolute Concentration des schnellen Säurefuchsines und durch die gute Deckkraft des schwarzblauen Farbstoffes für Roth, die diejenige des hellfarbigen Lichtgrünes weit übertrifft, bedingt ist. Nigrosin in der gleichen Mischung wie No. 4 gab dieselbe schöne Doppelfärbung. Dieses untere Optimum ist schon bei der vorigen Mischung (No. 9 und 10) angedeutet, kommt aber dort wegen der geringeren Deckkraft des Grünes nicht in voller Farbenreinheit heraus.

Tabelle IV. Säurefuchsin-Indulin.

Relative Diffusionsgeschwindigkeit: Säurefuchsin 1,4, Indulin 1. Sonst wie Tabelle I.

No.	Relative Concentration		Absolute Concentration		Testobject	
	Säure-fuchsin	Indulin	Säure-fuchsin	Indulin	grosse Granula	kleine Granula
1	1	15	0,017	0,25	tief roth, oft mit dunkelblauem Rand	dunkel stahlblau
2	1	4	0,1	0,4	roth	mischfarbig
3	1	1	0,25	0,25	„	roth
4	1	1	0,05	0,05	„	indulinfarben

3. Mischungen mit Eosin.

Da das Eosin ein sehr leuchtender und intensiver Farbstoff ist, so fällt dem langsamer nachfolgenden zweiten Bestandtheil des Gemisches eine schwierige Aufgabe zu, denn er muss das Roth ja theilweise decken. Das Optimum der absoluten Concentration des Eosines liegt in der That sehr tief, selbst gegenüber einer hohen relativen Concentration der langsameren Componente.

1) Eosin-Lichtgrün, klare, blaugrüne Mischung, die schon bei geringem Gehalt an Eosin durch stark rothen Schimmer dessen hohe Farbenintensität verräth.

Tabelle V. Eosin-Lichtgrün.
Relative Diffusionsgeschwindigkeit: Eosin 1,3, Lichtgrün 1.
Sonst wie Tabelle I.

No.	Relative Concentration		Absolute Concentration		Testobject	
	Eosin	Lichtgrün	Eosin	Lichtgrün	grosse Granula	kleine Granula
1	1	19	0,025	0,475	roth, mit grünlichblauem Mischschatten	mischfarbig
2	1	19	0,005	0,095	tief roth, oft mit grünem Rand	grün oder mischfarbig, blaugrün
3	1	9	0,01	0,09	roth, leicht mischfarbiger Rand	roth und Uebergang zur Mischfarbe
4	1	3	0,025	0,075	roth	roth
5	1	1	0,05	0,05	„	„

Trotzdem, dass in allen Versuchen die absolute Concentration des Eosines sehr niedrig genommen war, hat es doch eines 19-fachen Zusatzes von Lichtgrün bedurft, um die kleinen Granula zu überfärben. Und selbst das ist im günstigsten Falle (No. 2) doch nur theilweise gelungen, denn neben rein grün sind sehr viele, vielleicht die meisten, noch in der Mischfarbe, allerdings mit starker grüner Nuance gefärbt. Die Ueberdeckung der Pikrinsäure durch Säurefuchsin gelingt schon (Tab. I, No. 14) in Mischungen, die um $^1/_4$ so viel Roth wie Pikrinsäure enthalten, und Mischungen mit 4- oder 8mal so viel Säurefuchsin verleihen schon den grossen Granulis eine orangene Farbe (Tab. I, No. 1 und 2). Auch das viel schlechter deckende Lichtgrün überfärbt die Pikrinsäure nahezu bei 12-fachem und sicher bei 16-fachem Uebergewicht über sie (Tab. II, No. 1 und 2). Schwieriger überwindet das Lichtgrün schon das Säurefuchsin, das in Tab. III, No. 1 durch die 15-fache Menge noch nicht total ausgelöscht ist, die grossen Granula sind noch roth. Das Eosin wird selbst von 19mal so starkem Lichtgrün noch nicht einmal in den kleinen Granulis ganz verdeckt. Neben der hohen Farbenintensität im Allgemeinen wird auch noch der Umstand zu beachten sein, dass das Eosin färberisch zu den basischen Farben neigt und in wässriger Lösung nicht so weit unter dem Optimum seiner Färbekraft steht wie die anderen sauren Farben, z. B. Lichtgrün oder Indulin.

Die Platinalbumose färbte sich in 2 Stunden aus No. 2 der Tabelle V leidlich kräftig nur, aber gut chromatophil. Viel intensiver

wirkten auch hier farbenreichere Mischungen, z. B. Lichtgrün 10 ccm 2-proc. und 10 Tropfen 2-proc. Eosin, annähernd 2 Proc. vom ersteren, 0,1 Proc. vom letzteren, Verhältniss Eosin: Lichtgrün = 1 : 20, ähnlich wie No. 1 und 2. Nach 20 Stunden hatten sich die Spiegel der grossen Granula schön roth, ihr Rand und die kleinen Granula mischfarbig grün gefärbt. Auch in der viel dünneren Mischung No. 2 der Tabelle trat schon in 3 Stunden eine zwar schwache, aber reine Doppelfärbung ein.

2) Eosin-Nigrosin (Indulin) 1 : 19, absol. Conc. 0,005 und 0,095, entsprach nicht ganz, aber nahezu dem Optimum, grosse Granula blassrosa, kleine nigrosinfarbig.

4. Ehrlich's Gemisch für eosinophile Granulationen.

Die Mischung (von Dr. Grübler-Leipzig) enthält gleiche Theile von Aurantia, Eosin und Indulin, die in dieser Reihenfolge auch diffundiren, denn das Aurantia eilt bei den Diffusionsversuchen (p. 125) dem Eosin noch etwas voraus, wird aber von ihm leicht ganz gedeckt, so dass die endgiltige Färbung oft nur ein gelbrothes Eosin ist. Nach dem früher über Pikrinsäure-Eosin Mitgetheilten, ist die gleiche Concentration von Aurantia und Eosin ganz dazu geeignet, das erstere gänzlich mit dem letzteren zu überfärben. Das Indulin ist nach Früherem nicht im Stande, ein gleich starkes Eosin zu verdecken.

Verfolgt man die Färbung unter dem Mikroskop an einem Albumosechromat so wird man sehen, dass Aurantia und Eosin bald hinter einander herankommen und alles zunächst schön eosinig färben, besonders speichern die grossen Granula wieder viel davon und können, wenn nun das Indulin herantritt, nichts mehr davon aufnehmen. Dagegen wird dieses von den kleinen Granulis angenommen, die dadurch schmutzig-roth, schmutzig-violett, indulinfarben werden.

Obgleich die Farbstoffe in Glycerin gelöst sind, so diffundiren sie doch ebenso wie aus wässriger Lösung. Die Färbung ist eine reine Diffusionsfärbung, sobald, wie beim Testobject, alle Granula des Objectes die gleiche secundäre Chromatophilie haben und aus demselben Stoff bestehen, also auch die primäre Chromatophilie gleich ist. Um die Resultate an histologischen Objecten beurtheilen zu können, ist es noch nöthig, die Albumose mit anderer secundärer Fixirungschromatophilie darzubieten und die übrigen Eiweiss- und Nucleinkörper zu prüfen.

Albumose (40-proc.), indifferent mit Sublimat oder Formaldehyd gefällt, färbt sich schmutzig-röthlich, also mischfarben, der schmutzige Stich des als Grundfarbe eingelagerten Eosines stammt vom Indulin. Die Sublimatfällung besteht aus durchweg recht kleinen, gleichmässigeren Granulis, und daher fehlt die Veranlassung zur electiven Doppelfärbung. Der aus kleinen und grossen Granulis aufgebaute Formaldehyd-Niederschlag ist in Wasser zwar unlöslich, aber doch stärker quellbar, die grossen Granula verlieren dadurch ihr grösseres Adsorptionsvermögen und geben desshalb keine reinen Eosinfärbungen, obgleich sie, besonders an frischen Niederschlägen, auch dazu neigen.

Die secundäre Acidophobie der Niederschläge mit Hermann's Mischung, mit Platinchlorid äussert sich unverkennbar darin, dass Aurantia und Indulin auch nicht spurweise,

das Eosin nur als zarter rosaer Hauch aufgenommen werden. Erwärmt man z. B. die Platinalbumose nur wenige Minuten, so sind nunmehr alle grossen Granula schön eosinophil, die kleineren und kleinsten schmutzig-rothviolett mit starkem Indulinschein gefärbt.

Fällt man eine 20-proc. Albumose mit 0,5-proc. Chromsäure, so entstehen recht gleichmässige, kleine Granula, die alle schmutzigviolett sich färben; fällt man aber dieselbe Lösung mit 1-proc. Chromsäure, so entsteht ein zur Doppelfärbung wohl geeignetes Granulagemisch, und in der That sind die grossen Granula jetzt alle rein eosinophil, die kleineren schmutzig-roth, indulinig (Taf., Fig. 25) gefärbt. Das Chrom beeinträchtigt nicht, wie das Platin oder Osmium, die Adsorption der sauren Farben, und so kann bei ungleicher Korngrösse, genau wie bei dem Testobject, die Farbenelection rein physikalisch sich einstellen.

Eine solche Erklärung spricht auch Ehrlich selbst (II, p. 14, 15) aus für die β-Granulationen, die sich von den eosinophilen α-Granulationen nur durch die indulinige Färbung unterscheiden und kleiner als diese sind. Ehrlich betrachtet die α-Granulationen als die dichteren, die sich desshalb mit dem schneller diffundirenden Eosin sättigen, so dass das langsamere Indulin nicht mehr aufgenommen werden kann. Dieses findet nach Ehrlich in den breiteren intermicellaren Räumen der β-Granulationen bequem Platz. Schliesslich deutet Ehrlich die letzteren selbst als eine Vorstufe der eosinophilen. Trotz dieser physikalischen Erklärung dieser Election, hält Ehrlich (II, p. 45) an der chemischen Natur der Färbung fest. Unser Beispiel des Albumosechromates ist ein vollkommener Parallelfall zu den α- und β-Granulationen und bekräftigt Ehrlich's Vermuthung noch durch den Beweis, dass hier wirklich derselbe chemische Körper nach der Korngrösse durch Doppelfärbung rein physikalisch sortirt wird. Die Färbung der Leucocytengranulationen aus dem eosinophilen Gemisch ist also nicht dazu geeignet, stoffliche Differenzen sicher wiederzuspiegeln.

Hämoglobin mit Kaliumbichromat gefällt, färbt sich sehr intensiv rein aurantia, ohne jeden Hauch von Indulin und ohne merkliche Beigabe von Eosin; ebenso, nur schwächer ist die Färbung der Alkoholfällung, noch schwächer, aber immer noch recht kräftig die der schwach acidophoben Platinfällung. Das völlige Fehlen des Indulines erklärt sich aus dessen allgemeiner Farbschwäche in wässriger Lösung und aus der viel intensiveren Färbung, die Hämoglobin mit den anderen sauren Farben sogleich annimmt. Das Eosin schon vermag die stark mit Aurantia gesättigten Gerinnsel und Granula (Alkoholfällung) nur schwach zu nuanciren, das zuletzt kommende, ohnmächtige Indulin diffundirt spurlos vorbei. Dieser Eigenschaft des Hämoglobines entspricht auch die Färbung der rothen Blutkörperchen, z. B. in der Niere der Maus, sie sind rein aurantia (Sublimatfixirung).

Einfacher verläuft die Election bei Serumalbumin und Casein, die durch Platinchlorid leicht acidophob gestimmt, nur mittelstark aurantia mit schwachem Eosinstich werden. Bei Chrom- und Sublimatfixirung steigert sich die Eosineinlagerung etwas. Das Indulin fehlt ganz, weil die zarten Gerinnselchen wohl nur sehr geringe mechanische Affinitäten entwickeln, die erst in den isolirten Granulis oder bei sehr grober Punktirung, wie der der Nucleingerinnsel, so sich

vergrössern, dass neuer Farbstoff noch nach der Grundirungsfärbung aufgenommen werden kann.

Nucleinsäure, aus Hefe und Thymus, kann infolge ihrer tolalen Acidophobie sich in dem eosinophilen Gemisch überhaupt nicht färben.

Nuclein, indifferent mit Essigsäure gefällt, wird schmutzig-dunkelorange, hat also neben Aurantia und Eosin auch Indulin aufgenommen; ebenso nach Chromsäurefällung. Dagegen drückt Platin wiederum das Indulin ganz, das Eosin theilweise zurück, die Gerinnsel sind vorherrschend aurantia, mittelstark nur gefärbt. Wie das indifferent gefällte Nuclein färben sich auch die grobpunktirten Gerinnsel des mit Nucleinsäure gefällten Serumalbumines gleichmässig mischfarben, schmutzig-braunroth. Das gröbere Korn dieses Gerinnsels und desjenigen des Nucleines besitzt ein entsprechendes höheres Adsorptionsvermögen und nimmt deswegen noch Indulin auf.

Die Indulinfärbung der Kerne verlangt eine indifferente Fixirung, also Alkohol oder Essigsäure, am besten Sublimat, das ebenso wie die beiden anderen die primäre Adsorption nicht verschiebt, aber sie doch etwas steigert und so stärkere Färbung noch gestattet. Unbrauchbar aus oft erörterten Gründen ist Platin und Osmium und ihre Gemische; mittlere Resultate gestatten Chrom und Pikrinsäure. Mit Sublimat fixirte Wurzeln von Vicia färben sich in EHRLICH's Gemisch folgendermaassen: Chromosomen und Kerngerüst dunkel roth-indulig, deutlich sich abhebend gegen die eosinigen Nucleolen und das bräunlich-orangene Cytoplasma. In der Niere der Maus (Sublimat) erreicht die Indulinfärbung der Kerne fast noch mehr das Bild einer reinen Chromatophilie, obgeich auch hier ein starker rother Ton beigemengt ist. Das Cytoplasma war wie in den Wurzeln dunkelorange. Reine Indulinfärbung der Kerne, ohne jede Grundirung mit Aurantia-Eosin, habe ich niemals beobachtet, und damit schwindet für die chemische Theorie wieder jeder Anhalt für die Erklärung. Es ist auch diese roth-indulinige Kernfärbung als reine Diffusionsfärbung aufzufassen. An der Niere der Maus wurden noch unmittelbar unter dem Mikroskop einige zur Erklärung beitragende Färbungen beobachtet (vergl. p. 98). Hier sei wiederholt, dass alle sauren Farben zunächst nur das Cytoplasma färben und erst nach einigen Secunden die anfangs farblos bleibenden Kerne, die hierin ganz mit dem Nuclein übereinstimmen. Wie dieses sind auch die Kerne leicht acidophob. Das Cytoplasma dagegen nimmt saure und basische Farben gleich gut auf, nur das Indulin, das ja der schwächste Färber unter den sauren Farben ist, wird kurze Zeit verschmäht. So kommt es, dass Indulin allein zunächst gar nichts färbt und dass dann eine Spur schneller als das Cytoplasma die Kerne sich damit zu färben beginnen, weil sie, nachdem ihre Acidophobie einmal überwunden ist, nun sich schneller und stärker färben als das Cytoplasma. Die einzelnen Stadien der Färbung würden mit EHRLICH's eosinophilem Gemisch in folgender Ordnung sich beobachten lassen. Fast zusammen diffundiren Aurantia und Eosin, sie färben zunächst das Cytoplasma und später die Kerne. Sobald diese eben anfangen, roth zu überlaufen, tritt das Indulin heran und wird nun nachgespeichert bis zur Sättigung aller mechanischen Affinitäten. Im Cytoplasma, auf das das ohnmächtige Indulin weniger wirken kann, hat unterdessen das Orange eben vielleicht einen Hauch davon erhalten und erscheint nun dunkel braunorange.

Der ganze Vorgang verläuft als Diffusionsfärbung, die nur durch die schwache Acidophobie der Kerne etwas anders endet als bei dem Albumosechromat. Dort färben sich die grossen Granula intensiv mit Aurantia-Eosin und sind somit gesättigt, wenn das Indulin herantritt. In den Zellkernen aber verzögert sich zuerst die Aufnahme der rothen Farben, und bevor diese bis zur Sättigung gespeichert sind, kommt das langsamere Indulin heran und verleiht den Kernen eine schwärzlich-rothe Färbung, durch die sie sich electiv vom Cytoplasma abheben. Eine chemische Erklärung dieser Kernfärbung ist vollkommen überflüssig.

4. Homogene Gemische basischer Farben.

1. Methylgrün-Fuchsin (Jodgrün-Fuchsin vieler Autoren).

Das in der botanischen Zellforschung grosses Ansehen geniessende Gemisch Jodgrün-Fuchsin ist in Wirklichkeit Methylgrün-Fuchsin, denn das Jodgrün (vergl. p. 89) wird schon seit vielen Jahren nicht mehr fabricirt. Desshalb soll im Folgenden nur die richtige Bezeichnung Methyelgrün gebraucht werden, die jeder nach Belieben mit Jodgrün vertauschen kann. Eine zweite Correctur verlangt das Gemisch noch desshalb, weil alles Methylgrün und Pseudojodgrün stets mit Methylviolett verunreinigt ist, so dass die übliche Mischung thatsächlich ein Dreifarbengemisch aus Fuchsin, Methylgrün und Methylviolett ist. Durch diese Beimengung des Violettes werden natürlich etwas fremdartige Farbentöne eingeschmuggelt, von denen auch die Autoren öfters in der Meinung berichten, Mischfarben von Fuchsin und Methylgrün vor sich gehabt zu haben. Diese letzteren fehlen ja in keinem Präparat, aber daneben steigert noch das verunreinigende Methylviolett die Buntheit des Bildes.

Um den Antheil des Methylviolettes zu bestimmen, genügen einige Färbungsversuche mit dem ungereinigten Methylgrün ohne Zusatz von Fuchsin. Da das reine Methylgrün Chromalbumose oder ebenso die Chromfällung von Albumin gar nicht färbt, so wird man sich nicht wundern, dass das von Chrom nicht abgestossene Methylviolett nunmehr aufdringlich hervorkommt und scheinbar metachromatisch schön violett färbt. Nach p. 90 färben sich die Alkoholniederschläge von Hämoglobin, Albumin, Globulin gar nicht mit dem gereinigten Methylgrün, wesshalb das ungereinigte wieder alle diese Objecte rein violett färbt. Nur Nuclein und Nucleinsäure werden auch vom unreinen Farbstoff schön methylgrün gefärbt, weil das beigemengte Violett doch procentisch weit hinter dem Methylgrün zurücksteht und erst nach diesem diffundirt. Das für die folgenden Versuche, überhaupt für alle Gemische basischer Farben ausgewählte Testobject, 40-proc. Albumose gefällt mit (1+10) $PtCl_4$ (vergl. p. 38), wird schon vom unreinen Methylgrün allein doppelt gefärbt: die grossen Granula schön und rein methylgrün, die kleineren und kleinsten mit stark violettem Stich bis rein violett. Wer die Verunreinigung nicht kännte, würde eine glänzende Metachromasie ankündigen. Der Fall ist sehr beachtenswerth, weil er zugleich zeigt, wie auch bei beabsichtigten Mischungen der eine Farbstoff nur in sehr geringen Mengen vorhanden zu sein braucht, um Doppelfärbungen zu erzielen. Man wird Methylgrüne

gelegentlich erhalten, denen vielleicht weniger Violett beigemengt ist, aber ganz würden auch dann nicht die metachromatischen Färbungen ausbleiben. Nur wenn durch Amylalkohol alles Violett entfernt ist, färben sich alle Granula des Testobjectes rein methylgrün. Solches gereinigtes Methylgrün wurde benutzt, um zu bestimmen, wie viel Fuchsin zugesetzt werden muss für eine schöne Doppelfärbung des Testobjectes, d. h. die grossen Granula rein methylgrün, die kleinen rein und tief roth (Taf., Fig. 21). Diese quantitative Bestimmung kann nicht so genau werden, wie bei den sauren Farben, weil die wässrige Lösung des Fuchsines sich verändert und ausserdem ein Theil davon durch das Methylgrün ausgefällt wird. Ja, erst durch die partielle Fällung des Fuchsines wird die zur Doppelfärbung geeignete, relative Concentration der Componenten hergestellt. Das von der Fuchsinfällung abfiltrirte, klare Filtrat färbt ebenso gut doppelt, wie die ursprüngliche Mischung.

Wenn man eine heiss bereitete 0,1-proc. Fuchsinlösung, die wohl am besten der gesättigten Lösung der Autoren entspricht, nicht alt werden lässt, so kann man sie annähernd als constant einige Tage lang benutzen. Freilich ist nicht genau 0,1 Proc. gelöst, es soll aber der Einfachheit halber vorausgesetzt werden. Auch das mit Amylalkohol gereinigte Methylgrün, 0,5 Proc. des trockenen, unreinen Farbpulvers, müsste, um genaue Werthe zu bekommen, nachträglich quantitativ bestimmt werden. Da es sich überhaupt nur um Näherungswerthe handelt, so kann man davon absehen. Das Testobject verlangt auf 10 ccm des 0,5-proc. gereinigten Methylgrünes 3 Tropfen des 0,1-proc. Fuchsines oder, da 21 Tropfen 1 ccm geben: 0,14 ccm Fuchsin von 0,1 Proc. Es müssen also auf 1 Theil Fuchsin nicht weniger als 357 Theile Methylgrün kommen, wenn in 8 Minuten das Testobject doppelt gefärbt sein soll, so, dass keine weitere Differenzirung nothwendig ist (Taf., Fig. 21). Die absoluten Mengen Fuchsin sind verschwindend gering, nur 0,00014 g auf 0,05 g Methylgrün oder 0,3 Proc. Fuchsin, das ist so wenig, dass man der Lösung es gar nicht ansieht, dass sie Fuchsin enthält. Und doch genügt schon ein weiterer, kleiner „Schuss“ von Fuchsin, z. B. 3 Tropfen, um die Doppelfärbung zu verhindern, es färben sich jetzt alle Granula roth, weil das Fuchsin viel farbkräftiger ist als das Methylgrün.

Die unmittelbare Beobachtung der Färbung unter dem Mikroskop zeigt, dass zunächst das Methylgrün herandiffundirt und alles, grosse und kleine Granula blaugrün färbt, die grossen, entsprechend ihrem Substanzreichthum, sogleich sehr stark. Sehr bald kommt das Fuchsin nach und überdeckt das Methylgrün in den kleinen Granulis vollkommen, während die grossen blaugrün bleiben, auch wenn viel länger als 8 Minuten gefärbt wird. Da Fuchsin und Methylgrün dieselbe relative Diffusionsgeschwindigkeit (1,3 nach p. 124) haben, so entscheidet hier die relative Concentration. Das weit stärkere Methylgrün muss nach den Diffusionsgesetzen etwas beschleunigt, das stark verdünnte Fuchsin etwas gehemmt sein, und daher tritt zuerst das Methylgrün an das Object heran und färbt alles gleichartig. Entsprechend der hohen Concentration des Methylgrünes diffundiren sogleich grössere Mengen davon

heran, als später jemals vom Fuchsin herantreten können, das Verhältnis ist 1 Methylgrün : 0,003 Fuchsin. Die grossen Granula können also ihre starken mechanischen Affinitäten sogleich mit Methylgrün sättigen, während die kleineren Granula mit Roth sich überfärben.

Der Einfluss der Fällungsform auf die Doppelfärbung der Platinalbumose ist bereits p. 82, 83 besprochen worden. Auf dort verweisend, sei hier nur wiederholt, dass 40-proc. Albumose, mit 1-proc. $PtCl_4$ in kleineren Granulis gefällt, sich vorherrschend roth färbt (Taf., Fig. 23), während die eingesprengten, zahlreichen grösseren Granula unseres Testobjectes infolge der Concentrationfärbung blau bleiben. Die Nucleinsäurefällungen verlangen eine andere Zusammensetzung, was ja selbstverständlich erscheinen wird. Thymusnucleinsäure, mit (1 + 10) $PtCl_4$ gefällt (vergl. p. 44), färbt sich prachtvoll doppelt aus einem Gemisch von 20 ccm 0,1 Methylgrün und 1 ccm 0,1 Fuchsin: Granula tief blau, Gerinnsel rein roth. Diese absolute Concentration, ca. 0,005 Fuchsin und 0,095 Methylgrün, würde Platinalbumose rein roth färben. Die Nucleinsäure mit höherem Tinctionsvermögen darf nicht so viel Methylgrün dargeboten erhalten, weil sonst alles bereits sich damit tief sättigt, und das Fuchsin nicht mehr überdecken kann. Um aber wenigstens die Gerinnsel noch roth zu färben, muss auch die relative Concentration des Fuchsines höher sein. Trotzdem bleibt auch hier der Charakter der Concentrationsfärbung unverkennbar.

Auch in Zimmermann's (IV, p. 464) Lösung (9 Jodgrün, 1 Fuchsin) kommt die Vorherrschaft der Concentration noch deutlich zum Ausdruck, nur ist das Verhältniss 1 Jodgrün : 0,11 Fuchsin nicht so ungeheuerlich wie bei unserem Testobject. Das erklärt sich daraus, dass Zimmermann auf die Färbung noch eine Differenzirung mit Jodalkohol und Essigsäure (I, p. 6; II, p. 464) folgen lässt. Auch Lidforss hat sich dieser Differenzirung bedient, und Raciborski (II, p. 248) differenzirt mit absolutem Alkohol. Diese Methoden sind also nicht reine simultane Doppelfärbungen, sondern combinirt mit partieller Entfärbung, mit theilweisem Auswaschen des das Grün überdeckenden Fuchsines.

Zimmermann's Mischung färbte unser Testobject tief rothviolett, und erst bei der Nachbehandlung mit dem differenzirenden Alkohol erschien die Doppelfärbung untermischt mit allen Zwischennuancen.

Diese letzten Versuche wurden, um von den Autoren nicht abzuweichen, mit dem käuflichen, ungereinigten Methylgrün (vulgo Jodgrün) angestellt. Da Fuchsin sehr leicht und bequem das Methylviolett überdeckt, so weicht die Zusammensetzung der Mischung für unser Testobject gar nicht von der mit gereinigtem Methylgrün ab, was ja leicht zu verstehen ist. Die endgiltige Doppelfärbung entwickelt sich nur etwas anders. Erst wird alles blaugrün, dann färben die annähernd gleichzeitig herankommenden Violett und Fuchsin die kleinen Granula rothviolett bis roth. Die Doppelfärbung ist nicht minder schön als mit dem gereinigten Grün und war tadellos, wenn auf 10 ccm einer 0,5- oder 0,3-proc. Methylgrünlösung 3 Tropfen Fuchsin kamen.

Weitere Versuche mit dem unreinen Methylgrün sind noch zu erwähnen, um den Unterschied der Diffusionsfärbung der

Gemische saurer Farben von der Concentrationsfärbung der Gemische basischer Farben hervorzuheben.

Während ein Gemisch saurer Farben das procentische Uebergewicht desjenigen Farbstoffes verlangt, der die kleinen Granula zu färben hat, ist umgekehrt bei Methylgrün-Fuchsin und ähnlichen Gemischen es nothwendig, dass der für die grossen Granula vorherrscht und zwar mit Unterschieden, die für saure Farben nicht beobachtet werden. Hier schwankt die relative Concentration des langsameren Farbstoffes zwischen 19 (Tab. V, Eosin-Lichtgrün) und 0,25, wenn die des anderen = 1 angenommen wird. Höchstens 4-mal so dünn als dieser darf also der andere werden. Methylgrün-Fuchsin aber gibt noch in 8 Minuten ganz gleichmässig rothe Färbungen, wenn 39-mal so viel Methylgrün als Fuchsin gemischt wird, oder um es in die Zahlen der Tab. I—V zu übersetzen, wenn der Farbstoff für die grossen zum Farbstoff für die kleinen Granula sich verhält wie 1 : 0,026. Schon bei einem Verhältniss von 1 : 0,17 versagt Pikrinsäure-Säurefuchsin fast ganz die Doppelfärbung. Um eine solche mit Methylgrün-Fuchsin überhaupt erst zu erzielen, muss man auf 1 : 0,015 heruntergehen und, um wirklich intensive Färbungen zu haben, sogar auf 1 : 0,005 oder 1 : 0,003, d. h. auf 100 Theile Methylgrün nur 0,5 oder 0,3 Fuchsin.

Allgemein giltige Mischungsverhältnisse lassen sich freilich nicht aufstellen, denn jedes Object und dasselbe Object bei verschiedener Fixirung verlangt feinere Abstufungen. Mit Recht haben daher früher Zimmermann (I, p. 5; IV, p. 464) und Raciborski (II, p. 249) betont, dass die procentische Zusammensetzung nicht gleichgiltig ist für die Doppelfärbung.

Da das Methylgrün gegenüber Chromfällungen versagt, sobald die primäre Chromatophilie nicht so stark ist wie bei der Nucleinsäure und dem Nuclein, so ist es erklärlich, dass Zimmermann (I, p. 25, 26) nach Fixirung mit Merkel's Flüssigkeit (Chromsäure + Platinchlorid) besonders in der Nähe der Schnittflächen fast stets nur eine rothe Färbung sämmtlicher Differenzirungen des Kernes erhielt, weil hier jedenfalls die Chromsäure am stärksten sich festgesetzt hatte. Auch Lidforss (I, p. 7) klagt, dass bei Chromsäurefixirungen die Methylgrün-Fuchsin-Methode nicht glückte, während sie nach Fixirung mit Alkohol, Sublimat- oder Pikrinsäurealkohol immer sehr gut gelang. Zimmermann (IV, p. 463) überzeugte sich später, einem Winke Rosen's folgend, dass Sublimatfixirung viel günstiger für Methylgrün-Fuchsin ist als Merkel's Flüssigkeit. Die von den Genannten vergeblich gesuchte Ursache liegt in der Abneigung des Methylgrünes gegen chromirte Objecte.

2. Andere Gemische zweier basischer Farben.

Ausser den vorigen sind zwei basische Farben nur gelegentlich in Gemischen zu Doppelfärbungen benutzt worden. Dass auch sie Concentrationsfärbungen sind, bedarf wohl keines nochmaligen Beweises. So wird Fuchsin auch in Mischungen mit Methylenblau partiell ausgefällt und gibt ganz gleichsinnige Färbungen. Quantitativ habe ich die Verhältnisse hier nicht verfolgt. Nur sei erwähnt, dass das Testobject (Platinalbumose) für vorige Mischung auch schönste Chromatophilie in Methylenblau-Fuchsin gibt, die grossen Granula tief schwarzblau, die kleinen intensiv roth. Ebenso wurde, wie schon früher

beschrieben (III, p. 8), ein Granulagemenge aus Hermann'scher Albumosefällung gefärbt, ebenso auch Gerinnsel mit eingelagerten Granulis. Die eine Mischung (No. III, p. 53) war mit Altmann's Kaliumbichromatgemisch, die andere mit Hermann'scher Lösung gefällt. Beide enthielten schöne Albumosegranula eingebettet in Serumgerinnsel. Die letzteren färbten sich roth, die Granula tief blau in Mischungen von Methylenblau mit Fuchsin oder Safranin. Immer wieder die gleiche Rangordnung der Farbstoffe: der concentrirtere, das Blau, kommt zuerst und färbt die substanzreichen Granula so intensiv, dass der dünnere, partiell ausgefällte, der zwar bald nachhinkt, das Blau nur aus den lockerer gebauten Gerinnseln zu verdrängen vermag oder sie roth überfärbt.

Würde man Safranin und Gentiana vermischen, so würde das letztere partiell ausgefällt, und die höhere Concentration läge jetzt auf der Seite des rothen Farbstoffes. In der That färbten sich die Granula der oben erwähnten Mischung No. III jetzt intensiv roth, gerade umgekehrt wie in Safranin und Methylenblau.

3. Metachromatische Färbungen aus unreinen Farbstoffen und das sogen. Reifen der Farblösungen.

Die metachromatischen und polychromen Färbungen aus einfachen Farblösungen haben immer als besondere Stütze für die chemische Theorie der Färbung gegolten, denn hier schien es ja so, als ob gewisse Zellelemente mit dem Farbstoff eine neue, anders gefärbte Verbindung eingegangen wären. P. Mayer (II, p. 311—317) hat nachgewiesen, dass solche Metachromasien aus Jod- und Methylgrün, aus Methylenblau und Safranin auf geringen Verunreinigungen durch andere Farbstoffe beruhen. In einem Falle, Methylgrün (II, p. 312, Anmerk.), konnte P. Mayer noch an dem Farbstoff, der früher zu den metachromatischen Färbungen gedient hatte, die Beimengung von „sehr viel Violett" feststellen. Dem Methylenblau ist von der Fabrikation her leicht etwas Methylenroth beigemengt u. s. w. Ueber unreines Methylgrün und dessen metachromatische Färbungen vergleiche man p. 140.

Die Versuche über die Methylgrün-Fuchsinmischung scheinen mir besonders geeignet, noch einen Zweifel zu zerstreuen, der vielleicht bei Mayer's Erklärung der geläufigsten Metachromasien auftauchen könnte. Man könnte sagen, dass die Mengen der verunreinigenden Farben doch zu gering meistens sind, um eine elective Färbung zu gestatten, denn die Angaben, dass „viel" oder „sehr viel" beigemengt war, sind zu allgemein, um zu überzeugen. In den optimalen Methylgrün-Fuchsinmischungen war das Verhältnis 357 : 1. Würde man die unverdächtig aussehende Mischung als reines Methylgrün in die Hände bekommen, man würde zunächst nicht an ihrer Reinheit zweifeln. Als solche wäre sie mit 0,3-proc. Fuchsin verunreinigt, was doch gewiss als wenig zu bezeichnen ist, und doch gibt sie exemplarische Doppelfärbungen. Das Beispiel lehrt, dass die Beimengung des zweiten Farbstoffes nur sehr gering zu sein braucht, um Metachromasie zu erzeugen So geringe Verunreinigungen werden aber in der Fabrik sehr oft vorkommen, und daher sind metachromatische Färbungen selbst aus anscheinend ganz reinen Farbstoffen stets mit Misstrauen aufzunehmen. Auch dem viel-

gepriesenen Thionin sieht man es schon in der Lösung an, dass es ein Gemisch ist, und alle Farbstoffe mit violetten Tönen können rothe und blaue Verunreinigungen enthalten, die zu metachromatischen Färbungen führen müssen. Da es sich durchweg um basische Farben und um basische Verunreinigungen handelt, so ist die Metachromasie hier die Folge einer Concentrationsfärbung, genau wie die Doppelfärbung aus Methylgrün-Fuchsin. Ganz reine Farben werden unter den Anilinfarben überhaupt nur wenige zu finden sein, sehr rein sehen die sauren aus, unter den basischen wohl Fuchsin, Safranin und gutes Methylenblau. Das Methylgrün ist stets mit Violett verunreinigt. Sind Gemische zu gleichen Theilen aus glatt löslichen Componenten zusammengesetzt, dann gibt es auch eine einheitliche Färbung, weil die relative Diffusionsgeschwindigkeit der basischen Farben als nahezu gleich anzusehen ist und auch die Concentration gleich ist. Wird diese sehr ungleich, dann müssen bei geeigneten Objecten metachromatische Färbungen erscheinen.

Das sogen. Reifen der Lösungen ist bei Anilinfarben sicher oft das Gegentheil von dem, für was es zuweilen gehalten wird. Nicht ein Vortheil, sondern ein Nachtheil, weil einerseits durch das Glas, anderseits durch den Luftzutritt neue Farbkörper in geringen Mengen sich bilden können, die nun eine Metachromasie hervorrufen. Unna (IV, p. 477) hat für das Methylenblau eine solche Reifung zu metachromatischem Färbvermögen ausführlich untersucht.

4. Die Chromatophilie der Sexualkerne.

Auerbach's Chromatophilie der Geschlechtskerne wurde mit einer Mischung von Jodgrün-Fuchsin nachuntersucht und bestätigt von Strasburger (II, p.41), Raciborski (II), Lidforss (I, p. 20—26); Rosen (I, p. 10) benutzte von homogenen Gemischen basischer Farben Safranin-Jodgrün, das auch Strasburger (II, p. 42) theilweise verwendete. Der Erfolg war im Allgemeinen immer der, dass der generative Kern im Pollenschlauch cyanophil, der vegetative aber und der weibliche Kern im Embryosack erythrophil sich färbte. Dasselbe wurde mit anderen Methoden auch von Schottländer (I) für die Sexualkerne der Kryptogamen bestätigt. Kurz Auerbach's sonderbar erscheinende Behauptung, dass die männliche Substanz den blauen, die weibliche den rothen Farbstoff aus Gemischen aufnähme, bewahrheitete sich allgemein. Eine gänzliche Abneigung gegen den anderen Farbstoff besteht übrigens nicht, Auerbach selbst (II, p. 738) stellte fest, dass aus einfachen Farblösungen die cyanophilen Kerne auch den rothen Farbstoff aufnehmen und umgekehrt. Eine Erklärung sucht Auerbach (III) in der chemischen Verwandtschaft der Geschlechtsproducte zu den Farbstoffen, womit freilich die sonderbare Auswahl nach der Wellenlänge des absorbirten Lichtes nicht ihres mystischen Scheines entkleidet wird. Zacharias (I, p. 193) neigt zu der Annahme, dass die Vertheilung des Nucleines (Nucleinsäure) das Räthsel lösen könne. Er habe früher (VIII, p. 354, 367) mikrochemisch nachgewiesen, dass der vegetative Kern der Pollenschläuche und der Eikern ärmer an Nuclein seien als die generativen Pollenkerne, und da Nuclein aus einer Mischung von Säurefuchsin-Methylenblau sich cyanophil färbe, so wäre hiermit die Auerbach'sche

Erscheinung wohl vereinbar. Auch die Vertheilung der cyanophilen Substanz in den Spermatozoiden stimme mit der mikrochemisch controlirbaren Vertheilung des Nucleines überein (I, p. 193). Nach MIESCHER (I, p. 601) ist das freilich nicht durchweg der Fall, denn er sagt: „Il est intéressant pour la théorie de la coloration des noyaux de savoir que les substances colorantes connues comme réagissant spécialement sur la chromatine, comme la safranine, le vert de méthyle et aussi le violet de gentiane, ne colorent nullement de préférence l'enveloppe (NB. der Spermatozoiden des Lachses) qui est composée de nucléine, mais toutes au contraire colorent le contenu qui ne renferme pas de nucléine et qui, dans les bonnes préparations, se distingue par une coloration intense très nettement de l'enveloppe qui n'est pas très colorée. Cela rendra circonspect les histologistes qui seraient tentés, sans plus ample informé, d'appliquer aux corps renfermant de la nucléine les procédés de coloration indiqués par la chromatine.“ Auch später (III, p. 385) hat MIESCHER diesen Standpunkt annähernd beibehalten. Die Controverse, die ZACHARIAS hierüber eröffnet hat, kann uns hier nicht beschäftigen. Nur sei erwähnt, dass auch die neueste Arbeit von ZACHARIAS (VII) das Problem nicht an der Wurzel anfasst.

Ja, für den grösseren Nucleinreichthum des generativen Kernes und der Spermatozoiden scheint mir ZACHARIAS den Beweis noch schuldig zu sein. Denn aus manchen Stellen seiner Hauptarbeit hierüber (VIII, p. 355, 365, 366) ist doch nur zu entnehmen, dass das nucleinhaltige Kerngerüst immer enger und enger sich zusammenzieht, bis es schliesslich zum homogen erscheinenden Band des Spermatozoiden wird. So heisst es auch (VIII, p. 366): „dasselbe (Nucleingerüst) war im generativen Kern engmaschiger als im vegetativen, so dass man im Allgemeinen den Eindruck erhielt, der generative Kern sei der nucleinreichere, sehr erheblich sind die Differenzen hier jedoch nicht.“ Dies gilt für Pollenschläuche von Tradescantia. Auch in den Pollenschläuchen von Thujopsis fehlte doch dem vegetativen Kern ein Gerüstwerk nicht gänzlich, und wie viel davon aus Nuclein bestand, war doch mit der Verdauungsmethode von ZACHARIAS nicht sicher zu ermitteln. Auch die Nucleinarmuth der weiblichen Kerne beruht nach ZACHARIAS (VIII, p. 370) eigentlich doch nur darauf, „dass das ursprünglich im Eikern vorhandene Nuclein während der erheblichen Vergrösserung, welche der Kern bei der Ausbildung des Eies erfährt, sich mehr und mehr im Kern vertheilt, ohne zuzunehmen“. Anderseits wird an zwei Stellen (VIII p. 355, 365) bemerkt, dass es weiterer Untersuchung bedürfe, „ob eine Zunahme des Nucleingehaltes stattfindet, wenn der Kern sich zum Schraubenbande“ des Spermatozoides umbildet. Schält man den Kern aus diesen schwankenden Aussprüchen heraus, so hat ZACHARIAS eigentlich nur bewiesen, dass die Kernmasse in den männlichen Elementen dichter zusammengelagert ist als in den weiblichen, und desshalb müssen natürlich auch nach der Verdauung im ersten Fall glänzendere Nucleinmassen übrig bleiben als im zweiten, wo die weiter ausgebreiteten lockeren Netze viel zarter sind. Nimmt man an, dass die Zellkerne, aus denen die männlichen und weiblichen Elemente sich hervorbilden, also z. B. der Kern einer Spermatozoidmutterzelle und der Kern in der Bauchzelle eines Farnarchegoniums gleich

viel, n Proc. Nucleinsäure enthalte, so wird dies im reifen Spermatozoid auf einen viel engeren Raum vertheilt als in dem grossen Eikern. Der Procentgehalt hat sich aber nicht geändert, die männlichen Elemente sind nicht reicher an Nucleinsäure. Nur volumprocentisch besteht ein Unterschied. Dieser ist aber nicht anders als der zwischen grossen und kleinen Granulis aus Platinalbumose oder der zwischen den Granulis und den zarten Gerinnseln der Thymusnucleinsäure. Diese Objecte färben sich (p. 141) mit Methylgrün-Fuchsin wundervoll chromatophil, die grossen substanzreicheren Granula blaugrün, die anderen roth, Die Concentrations-Doppelfärbung liegt hier in vollster Reinheit vor uns. Die Erklärung, die p. 141 hierfür entwickelt wurde, passt auch ohne weiteres auf die Farbenelection der Geschlechtskerne aus Methylgrün-Fuchsin, die aus einem ungleichen Nucleingehalt überhaupt nicht erklärt werden kann, denn Nuclein (Nucleinsäure) färbt sich mit jeden dieser beiden basischen Farbstoffe gleich gut. Die heterogene Mischung Säurefuchsin - Methylenblau, für die ZACHARIAS seine Erklärung ausbaute, wirkt auch nicht so, wie er vermuthet (vergl. p. 148).

STRASBURGER glaubte (II, p. 36—43) die Chromatophilie der Sexualkerne einer ungleichen Ernährung zuschreiben zu dürfen, gute Ernährung führe zur Erythrophilie, schlechte zur Cyanophilie. Gegen diese in der Luft schwebende Anschauung hat sich bereits ZACHARIAS (I, p. 194) gewendet, und auch einige harmlose Versuche, die LIDFORSS (I, p. 20—26) anstellte, um durch „bessere" Ernährung in Peptonzuckerlösung den generativen Kern im Pollenschlauche erythrophil zu machen, blieben, wie vorauszusehen war, erfolglos.

Vergleicht man die Beschreibungen, die verschiedene Beobachter von den roth und blau sich färbenden Kernen gegeben haben, so ist man überrascht von der, in Zellfragen sonst so seltenen Uebereinstimmung. Die erythrophilen Eikerne und vegetativen Kerne im Pollenschlauche werden von SCHOTTLÄNDER (I, p. 273), ROSEN (I, p. 11), ZACHARIAS (VIII, p. 370), STRASBURGER (II, p. 39) als locker gebaut, mit weitmaschigem, dünnfädigem Netzwerk geschildert; der cyanophile männliche Kern aber als sehr dicht, aus stark lichtbrechender, fast gequollener Masse gebildet (ROSEN I, p. 10), und Aehnliches. ROSEN beschreibt auch (I, p. 12, Taf. XVI, Fig. 13 und 15), dass um den Embryosack von Fritillaria herum ein Kranz von Zellen mit cyanophilen Kernen sich legt und dass diese „compact" wie der generative Kern im Pollenschlauch aussehen.

Kurz durchgängig sind die rothen Kerne locker, die blauen dichter gebaut. Dieser Umstand, der allein schon die chromatophile Färbung erklärt, hielt dennoch ROSEN nicht ab (I, p. 12), anzunehmen, dass die Rothfärbung der weiblichen Kerne bedingt sei „durch die besonderen in ihnen enthaltenen Substanzen oder deren Structur". Später (II, p. 303) spricht ROSEN sich noch deutlicher aus und führt die Cyanophilie auf das Vorkommen des Nucleines zurück, sein Fehlen mache die Kerne erythrophil. Hier ist vollkommene Abneigung gegen jede physikalische Erklärung vorhanden. Eine solche hält dagegen STRASBURGER (II, p. 127) doch nicht für ausgeschlossen. Sie würde ja auch mit seiner Ernährungshypothese zu vereinigen sein, wenn

nur nicht gerade die schlecht ernährten cyanophilen Kerne die substanzreicheren wären und gerade desshalb sich blau färbten.

Das mysteriöse Dogma Auerbach's, dass das weibliche Geschlecht das Roth der Liebe, das männliche aber das Blau der Treue bevorzuge, löst sich also auf als die banale Folge einer einfachen physikalischen Differenz. Dass die männliche Befruchtungsmasse auf ein möglichst kleines Volum zusammengedrängt wird, ist biologisch leicht erklärlich. Denn die Spermatozoiden müssen den engen Kanal des Archegoniums passiren, und der generative Kern des Pollenschlauches hat auf seiner Wanderung zum Ei erst recht durch enge Wege sich durchzuzwängen. Als unausbleibliche Folge dieser Verdichtung der männlichen Substanz, als weiter nichts ist ihre Cyanophilie in Methylgrün-Fuchsin zu deuten. Da anderseits die Substanz des weiblichen Kernes im Ei sich ohne Schranken beliebig ausdehnen kann, so ist sie erythrophil. Vegetative Gewebskerne färben sich im Ruhestadium oft blau, aber andere roth oder mischfarben, immer nur entsprechend dem jeweilig herrschenden, mit der dichteren oder lockereren Zusammenlagerung der Substanz variablen Adsorptionsvermögen.

Die färbungsanalytische Scheidung der Sexualkerne gelingt aber auch mit einem heterogenen Gemisch von Säurefuchsin-Methylenblau (Zacharias I, p. 192; Rosen I, p. 10) oder Rhodamin-Methylenblau (Rosen). Endlich auch durch succedane Doppelfärbung (Schottländer, I, p. 269), die mit halbstündiger Wirkung von 0,1-proc. Säurefuchsin eingeleitet und mit Methylenblau (0,2-proc., $^1/_2$—1 Minute) beendet wird. Sowohl bei dieser Doppelfärbung als auch in dem heterogenen Gemisch entscheidet neben der physikalischen Differenz der Kerne noch ein Zweites, die ungleiche Färbkraft der Componenten gegenüber den nucleinhaltigen Kernen, was ja nach p. 98 ganz erklärlich ist. Das Säurefuchsin diffundirt zwar im Gemisch vor dem partiell ausgefällten Methylenblau, es färbt aber, selbst bei Sublimatfixirung, in wässriger Lösung die Kerne nur langsam und um so langsamer, je dichter die Substanz hier zusammengedrängt ist, um so schneller, je lockerer. So beladen sich nur die weiblichen Kerne mit dem Säurefuchsin, die dichteren männlichen widerstehen einige Zeit und nehmen dann das bald folgende Blau auf. Würde man umgekehrt ein basisches Roth und ein saures Blau vermengen, so würden sich sicherlich die cyanophilen männlichen Elemente roth, die weiblichen blau färben. Würde Schottländer das Säurefuchsin mit Schwefelsäure versetzen, so würden sich die cyanophilen männlichen Kerne intensiv roth färben, und man könnte dann nach partieller Entfärbung mit Laugenalkohol die weiblichen, erythrophilen Kerne mit Methylenblau nachfärben. Die physikalische Theorie der Färbung vermag, wie man sieht, zwanglos die sexuelle Chromatophilie zu erklären.

5. Heterogene Gemische.

1. Die Basophilie der Kerne.

Theoretisch bieten die Mischungen einer basischen und einer sauren Farbe manche Schwierigkeit, weil hier Diffusions- und

Concentrationsfärbung in einander greifen. Die basische Farbe ist immer partiell gefällt, sei es weil sie in der Lösung der sauren weniger löslich ist als in reinem Wasser, sei es, dass durch chemische Wechselwirkung auch unlösliche Verbindungen der Farbbase mit der Farbsäure entstehen. Findet eine solche chemische Umsetzung statt, so wird, gleichviel ob ein löslicher oder unlöslicher Körper sich bildet, die Mischung ausserordentlich complicirt, worüber ich den Abschnitt über die Dreifarbengemische zu vergleichen bitte. Sicher ist aber der basische Farbstoff durch partielle Fällung zurückgedrängt, wodurch auch seine Diffusionsgeschwindigkeit herabgesetzt wird.

Ein anderer Nachtheil ist der schon oft erwähnte, dass die sauren Farben nicht in voller Färbkraft mit den basischen concurriren können. Je nach dem Object wird also der Färbungserfolg schwanken. Wählt man ein Object, das mit sauren und basischen Farben sich gleich gut färbt und zugleich grosse und kleine Granula enthält, so muss der zuerst kommende saure Farbstoff die grossen intensiv färben, der zurückgedrängte basische die kleinen. Ist dagegen das Object ganz acidophob, wie die Nucleinsäure, so ist eine reine „basophile" Färbung selbstverständlich. Hat das betreffende Object aber nur eine schwache Abneigung gegen saure Farben, so genügt diese doch, um den auf Augenblicke verschmähten sauren Farbstoff durch den nachfolgenden basischen ganz auszuschliessen. Ist die partielle Acidophobie sehr gering, so nimmt das Object noch einen Hauch der sauren Farbe auf, die aber bald durch die basische vollkommen zugedeckt wird, bald zu einer Mischfärbung führt, in der die basische Farbe stark vorherrscht.

Diese Beziehungen erklären vollkommen die „Basophilie" der Kerne und Chromosomen in heterogenen Gemischen, z. B. in Säurefuchsin-Methylenblau oder in Ehrlich's Triacid oder Biondi's Dreifarbengemisch.

Es kommt hier auf äusserst kleine Zeitunterschiede an, denn wenn das Grün nur etwas später käme, würde es die Kerne schon roth vorfinden; ebenso wenn etwas zu viel Säurefuchsin zugesetzt war, denn erstens diffundiren jetzt grössere Mengen davon in der Zeiteinheit, und zweitens wird mehr Methylgrün ausgefällt. Umgekehrt wirkt ein geringes Uebermaass des letzteren, auch das Cytoplasma wird grün. Daraus erklärt sich die grosse Launenhaftigkeit solcher Färbungen, das Auftreten zahlreicher Mischfarben. Ferner erklärt sich auch hieraus, dass eine bestimmte Färbzeit eingehalten werden muss, damit nicht durch zu langes Färben die ursprüngliche Election verwischt und überdeckt wird

Dass die Kerne und Chromosomen bei indifferenter Fixirung (Sublimat) sich „basophil" färben, beruht zweifellos auf ihrem Gehalt an Nuclein, das, wie schon gezeigt wurde und noch zu zeigen ist, schwach acidophob ist. Freie Nucleinsäure ist nach p. 53 und p. 99 nicht in den Kernen enthalten. Um den Charakter dieser heterogenen Gemische noch genauer zu illustriren, seien noch einige Beispiele beigefügt.

2. Zweifarben-Gemische.

Da die quantitativen Verhältnisse wegen der partiellen Fällung des basischen Antheiles ebenso unsicher zu übersehen sind, wie beim

Methylgrün-Fuchsin, so wurden nur eine Anzahl auf gut Glück zusammengeschütteter Mischungen geprüft. Als Testobject diente Albumose (20-proc.), gefällt mit 1-proc. Chromsäure, das wiederum zeigt, wie derselbe chemische Körper sich electiv doppelt färbt, sobald grosse und kleine Granula davon abgeschieden worden sind.

No.	Farbenmischung	Grosse Granula	Kleine Granula
1	Säurefuchsin + Methylenblau	roth	blau und violett, mischfarbig
2	„ + Methylgrün	„	bläulich
3	Lichtgrün + Fuchsin	bläulichgrün	roth
4	„ + Safranin	„	„
5	„ + Methylviolett	grün	violett

Unter dem Mikroskop lässt sich verfolgen, dass der saure Farbstoff stets voraus ist und alles, besonders aber die grossen Granula entsprechend färbt, meist so stark, dass der nachfolgende basische nur noch den Rand färben oder mischfarbig anhauchen kann, während er in den kleinen den sauren Farbstoff überdeckt, um so leichter, weil alle basischen Farben besser decken als die sauren.

Zacharias empfiehlt besonders das Säurefuchsin-Methylenblau zur Erkennung der Nucleinkörper im Kern und den Kernderivaten, z. B. den Spermatozoiden. Sicher ist ja, dass Hefenuclein, gefällt mit Essigsäure, Chromsäure, Flemming's und Hermann's Lösung, reinem Platinchlorid aus dem rothblauen Gemisch, sich stets rein blau färbt. Diese „Basophilie“ des Nucleines beruht aber nur auf einer schwachen Acidophobie und der äusserst starken Deckkraft des Methylenblaues, das blasse und selbst mittelstarke Vorfärbungen von Säurefuchsin ganz zudeckt und hierin dem Methylgrün sicher überlegen ist. Nach Zacharias (I, V, VI) sollen sich die Nucleinkörper sogleich blau färben und nicht erst roth. Ich habe die Färbung der Essigsäurefällung unter dem Mikroskop verfolgt und konnte doch eine deutliche primäre Rothfärbung entsprechend der Diffusion feststellen, später überdeckte bald das Methylenblau. Gerade dessen grosse Deckkraft wird auch ganz schwache Acidophobie, die zunächst recht gute Rothfärbung gestattete, verhüllen und so „Nucleinfärbung“ an Kerntheilen hinterlassen, die chemisch anders zusammengesetzt sind. Auch die neuesten Angaben von Zacharias (VII, p. 193) über Tritonspermatozoen vertragen sich mit der hier vertretenen Auffassung.

3. Dreifarbengemische.

Ehrlich's Triacid und Biondi's Gemisch.

Beide Gemische enthalten Methylgrün, mit dem, da es vorher nicht gereinigt wird, stets mehr oder weniger viel Methylviolett eingeführt wird. Das würde nicht viel schaden, wenn nicht das Methylgrün noch besondere Launen hätte und (vergl. p. 90) viele Eiweisskörper, die andere Farbbasen, z. B. auch Methylviolett, sehr gut aufnehmen, gar nicht oder nur so schwach färbte, dass eine Ueberdeckung durch das verunreinigende Violett unausbleiblich ist. Das

Hervortreten der dem Histologen unbekannten Verunreinigung wird noch begünstigt dadurch, dass alle chromhaltigen Fixirungsmittel specifisch absperrend gegen Methylgrün wirken. So glücklich die Wahl des Methylgrünes im übrigen ist, so verhängnissvoll kann es durch das ihm stets anhängende Violett werden. Manche Klage über die Unzuverlässigkeit der beiden Gemische und manche Meinungsverschiedenheit, die sich hieran knüpft, wird wohl dem Methylviolett zuzuschreiben sein. Da man vermuthen könnte, dass die neutrophile, schön violette Färbung, die EHRLICH's Triacidlösung gewissen Zellelementen verleiht, vom verunreinigenden Methylviolett herrühre, so ist besonders hervorzuheben, dass dieses wohl den neutrophilen Ton verstärken könnte, aber sicher nicht allein oder auch nur vorherrschend hervorruft, sondern dass hier anderes einwirkt. EHRLICH (II, p. 47, 127) nimmt mit Recht an, dass ein neuer „neutraler“ violetter Farbstoff dadurch entsteht, dass die Rosanilinsulfonsäure des Säurefuchsines sich mit der Base des Methylgrünes verbindet und dass dieses neutrale Violett die neutrophile Färbung bedingt. Solche Umsetzungen sind ja chemisch unausbleiblich, aber es wird in dem Gemisch, das doch auch noch Methylorange enthält, der Wirrwarr von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Componenten noch viel grösser; denn es muss sich auch die Farbsäure des Methylorange mit der Base des Methylgrünes chemisch verbinden. Die gebräuchliche Reihenfolge der Mischung ist wohl die, dass man die Lösungen des Säurefuchsines und Methylorange zunächst vereinigt und dann das Methylgrün zugiesst, diesem somit die Möglichkeit gegeben ist, sich mit beiden Farbsäuren zu verbinden, in Verhältnissen, die sich ohne genaue Analyse gar nicht bestimmen lassen. Dasselbe gilt, wenn man die 3 Farben trocken mischt und gemeinsam löst.

Um einige Einblicke in diese complicirten Verhältnisse zu bekommen, habe ich mit dem Testobject Albumosechromat (40-proc. Albumose, gefällt mit 2,5 Kaliumbichromat) folgende Versuche angestellt. Gereinigtes Methylgrün allein färbt gar nicht, das rohe, mit Methylviolett verunreinigte intensiv violett. Mit Säurefuchsin allein gefärbte, tief rothe Granula werden, wenn man 10 Min. mit gereinigtem Methylgrün überfärbt, tief violett, neutrophil. Ob hier zwischen dem gespeicherten Säurefuchsin und dem Methylgrün intragranulär noch eine chemische Umsetzung zu einem „neutralen“ Farbstoff stattfindet, oder ob einfache Ueberdeckungsfärbung die neue Nuance erzeugt, ist nicht so leicht zu entscheiden. Ich nehme das erstere an, weil ja, wie wir später sehen werden, gespeicherte Farbstoffe vollkommen reactionsfähig geblieben sind. Aus einem Gemisch gleicher Theile von 0,5-proc. Säurefuchsin und 0,5 gereinigtem Methylgrün färbt sich unser Object ebenfalls violett, neutrophil, ungefähr ebenso, wie die kleinen Granula aus EHRLICH's Triacidlösung sich färben. Würde man die Mischung Säurefuchsin-Methylgrün procentisch variiren, so müsste man es auch erreichen, die grossen Granula rein roth, die kleinen neutrophil zu färben, denn sicher eilt das Säurefuchsin dem neu entstandenen neutrophilen Farbstoff voraus. Solche Versuche wurden nicht gemacht. Dieselbe Betrachtung gilt auch für ein Gemisch von Orange-Methylgrün. Gleiche Theile einer concentrirten Orange- und einer 0,5-proc. gereinigten Methylgrünlösung geben eine tief moosgrüne Mischung, die von winzigen, giftig grünen Partikeln stark getrübt ist. Diese Gebilde sind ein neuer, neutraler Farbstoff, entstanden durch die Vereinigung

der Säure des Orange mit der Base des Methylgrünes. Das Gemisch färbt auch, nachdem es filtrirt ist, unsere Testobjecte in der That prachtvoll doppelt: grosse Granula schön gelb, an Pikrinsäure erinnernd, kleinere und kleinste schön gift- oder moosgrün in der Farbe der Mischung. Das reine Methylgrün fehlt scheinbar ebenso wie bei den Mischungen mit Säurefuchsin. Und doch fehlt es nicht ganz, denn Hefenucleinsäure färbt sich rein methylgrün. Die chemische Theorie der Färbung könnte hier annehmen, dass die sauren Qualitäten der Nucleinsäure die Base des Methylgrünes aus seiner Vereinigung mit der Säure des Orange herausreissen und so die elective, rein basophile Färbung zu Stande kommt. Die physikalische Theorie würde annehmen, dass nicht alles Methylgrün mit dem Orange chemisch verbunden ist, sondern dass ein Theil unverändert, nur verdeckt von den anderen Farben, in der Lösung steckt und dass die „neutralen" Farben, die Methylgrün mit Orange oder Säurefuchsin bildet, besondere Eigenschaften haben, die die Färbung der Nucleinsäure verhindern. Es käme also darauf an, diese reinen neutralen Farben in derselben Weise ausführlich zu untersuchen, wie hier die sauren und basischen untersucht worden sind. Das soll einstweilen unterbleiben.

Man wird so viel zugeben müssen, dass ein Gemisch von Orange, Säurefuchsin und gereinigtem Methylgrün nicht drei, sondern fünf Farbstoffe enthält: ausser den chemisch nicht veränderten Theilen der 3 Componenten noch ein neutrales Violett (Säurefuchsin + Methylgrün) und ein neutrales Moosgrün (Orange + Methylgrün). Säurefuchsin und Orange allein gemischt, gibt eine Fällung langer bräunlicher Krystallnadeln, die wohl aus gefälltem, überschüssigem Orange bestehen und nicht auftreten würden, wenn man geeignete Concentrationen der beiden sauren Farben mischte.

Wie viel nun von den drei Farben unverändert sich erhält, wie viel zu neutralen Farben sich verbindet, wie viel endlich einfach ausgefällt wird, dass ist ohne quantitative Untersuchung gar nicht zu sagen und hängt von der relativen Concentration der drei Gemischcomponenten ab. Diese ist in den beiden fraglichen Gemischen verschieden, wie folgende, nach dem üblichen Recept berechnete Tabelle zeigt, aus der freilich nicht die absoluten Mengen zu ersehen sind, weil die concentrirten Lösungen der 3 Componenten keineswegs gleichprocentisch sind. Nimmt man der Einfachheit halber an, was aber sicher falsch ist, dass sie gleich wären, so ergibt sich folgendes Verhältniss:

	Triacid		Biondi's Mischung	
Orange	33,3	1	59	2,04
Säurefuchsin	33,3	1	12	0,41
Methylgrün	33,3	1	29	1

Das Methylgrün verhält sich also im Triacid zu den beiden sauren Farben wie 1 : 2, in Biondi's Mischung wie 1 : 2,45, ist also in der ersteren im Vergleich zu der letzteren um 14 Proc. concentrirter. Die Möglichkeit, dass mehr Methylgrün unverändert bleibt, ist also im Triacid viel grösser als in Biondi's Gemisch. Da das letztere circa noch einmal so viel Orange enthält als das Triacid, so ist zu erwarten, dass mehr von der moosgrünen Neutralfarbe entsteht, viel

weniger von der violetten, aus Säurefuchsin und Methylgrün sich bildenden. Im Triacid aber würden beide Neutralfarben in gleicher Menge sich bilden können, und es früge sich nur, welche von beiden löslicher in Wasser ist. Das ist sicherlich die violette Farbe, die also in dem Triacid dominiren muss, während in BIONDI's Gemisch die moosgrüne öfter aufdringlich hervortreten könnte.

Dem entspricht auch die Färbung unseres Testobjectes (Taf., Fig. 15, 16, 24). Dessen grosse Granula färben sich in beiden Fällen gelbroth oder roth mit den zuerst diffundirenden Orange und Säurefuchsin, von denen das Orange gewissermaassen als Grundirungsfarbe für das Roth dient und dieses satter macht. In EHRLICH's Triacidlösung werden die kleinen und kleinsten Granula, aber wieder immer nur diese, niemals die grossen, tief violett (Taf., Fig. 16 u. 24), in geeigneter BIONDI'scher Mischung aber moosgrün (Taf., Fig. 15); in beiden Fällen färben sie sich neutrophil. Das reine Methylgrün kann an unserem chromirten Testobject gar nicht hervortreten (vergl. p. 90). Man wird übrigens, wenn man das von GRÜBLER beziehbare Pulver benutzt, mit BIONDI's Mischung nicht so schöne moosgrüne Farben bekommen, sondern mehr violett-neutrophile. Die abgebildete Färbung stammt von einem selbst hergestellten Gemisch, dessen Theile gelöst vermengt wurden. Sie trat bei mehrfachen Wiederholungen und genauer Einhaltung der Mischverhältnisse immer wieder ein, aber blieb aus, sobald die Zusammensetzung der Lösung sich änderte. Man ist eben bei diesen Mischungen sehr grossen Schwankungen ausgesetzt, über die man sich durch einige verhältnissmässig constante Färbungen, wie die dunkelgrüne der Kerne und die rothe der eosinophilen Granulationen nicht hinwegtäuschen lassen darf. Aber weder diese constanten, noch die bunteren schwankenden Färbungen sprechen für eine chemische Grundlage der Tinction, sie sind alle auch nach den hier entwickelten Anschauungen erklärbar. Nur bedürfen diese Dreifarben-Gemische noch einer quantitativen Bearbeitung.

Die Wahl des Methylgrünes als einzigen basischen Bestandtheiles geht wohl von dessen alter Benutzung zur Kernfärbung aus, die ja in der That noch durch die specifischen, früher (p. 90) schon besprochenen Eigenthümlichkeiten gefördert wird. Auch für die Blutuntersuchung wäre das Methylgrün nicht durch andere Farbbasen ersetzbar, denn gerade die specifische Abneigung des Hämoglobines gegen Methylgrün steigert die elective Färbung. Hämoglobin, gleichviel ob mit Alkohol oder Platinchlorid oder Kaliumbichromat gefällt, färbt sich aus beiden Gemischen vorherrschend roth oder roth-mischfarbig, sicher niemals grün.

Die Diffusionsgeschwindigkeit der Componenten ist derart, dass zuerst Orange und, ihm auf dem Fusse folgend, Säurefuchsin kommen, denen sehr schnell die neutralen Farben, also Violett oder Moosgrün folgen, und mit diesen diffundirt jedenfalls auch das chemisch nicht gebundene Methylgrün, nur ist seine Farbe versteckt in der neutralen Mischfarbe.

Sehr deutlich tritt der Einfluss der Fällungsform für die Chromatophilie an der Sublimat-Albumose hervor, die aus gleichmässigen, sehr kleinen Granulis und Aggregaten davon besteht und nur wenige grössere Granula enthält. Triacid färbt alles neutrophil, BIONDI's Gemisch alles mischfarbig, wobei noch auf Folgendes zu achten ist. Das Präparat lässt 3 Zonen unterscheiden: ein breites, rein rothes,

fuchsinophiles Centrum, einen rein grünen Rand und dazwischen eine breite Uebergangszone mit Mischfarben, die nach dem Centrum zu roth, nach dem Rande zu grün übergehen. Man hat hier gewissermaassen eine Doppelfärbung des ganzen, dem Deckglas aufgetrockneten Niederschlages aus Sublimat-Albumose vor sich. Die Erklärung ist einfach. Wenn das Deckglas mit der Farblösung bedeckt wird, so diffundirt diese vorwiegend parallel zu seiner Oberfläche. Rings vom Rande des aufgetrockneten Niederschlages aus wandern also die Farbstoffe in der oft genannten Reihenfolge nach der Mitte und geben so die Zonenfärbung. Die abweichende Randfärbung wird auch an Schnitten oft zu bemerken sein und erklärt sich ebenso.

Starke secundäre Acidophobie zeichnet die Albumose aus, wenn sie mit HERMANN's Platinosmiumessigsäure gefällt war. BIONDI's Lösung färbt jetzt rein grün, während im Triacid schmutzig-grüne Töne vorherrschen, bedingt durch den stärkeren Gehalt an Säurefuchsin.

Die schwächer acidophobe Platinalbumose (40-proc., gefällt mit 1+10 $PtCl_4$) färbt sich nicht rein grün, sondern ausgesprochen electiv, nur sind die grossen Granula oft blassroth, die kleinen entweder neutrophil (Triacid) oder grünlich (BIONDI), dazwischen auch Mischfarben. Beträchtliche Verlängerung der Färbzeit bessert die Doppelfärbung zwar auf, kann aber leicht auch zu basophiler Ueberdeckung der grossen Granula führen. Alle diese Nebendinge verstehen sich nach dem bereits Mitgetheilten von selbst.

Serumalbumin, indifferent mit Sublimat gefällt, wird im Triacid gleichmässig neutrophil, in BIONDI's Lösung ebenfalls mischfarbig. Durch Chromfällung wird das Methylgrün deutlich zurückgedrängt, die Färbung wird röther, ohne aber in reines Roth umzuschlagen. Die Platinstimmung des Serumalbumines steigt bis zu reiner Grünfärbung der zarteren Gerinnsel.

Casein färbt sich aus Triacid sehr schön neutrophil, gleichviel ob es mit Platinchlorid oder Kaliumbichromat gefällt war. Das säurefuchsinärmere BIONDI'sche Gemisch gibt in 6 Min. rein grüne Färbung, worin sich die chemischen Beziehungen zu den Nucleinkörpern bereits verrathen.

Nucleinsäuren werden stets, unbeeinflusst von dem Fällungsmittel, rein methylgrün, rein „basophil".

Nuclein, mit Essigsäure gefällt, färbt sich mit Triacid neutrophil, während in BIONDI's Lösung Grün deutlich vorherrscht, nur ein leichter rother Schein dazu tritt. Unter dem Mikroskop sieht man, dass beide Gemische zunächst schwach orange-roth anfärben und dass sehr bald das Grün mehr oder weniger überdeckt. Da aber Methylgrün keine sehr kräftige Deckfarbe ist, so bleiben Mischfarben übrig. Viel deckfähiger ist Methylenblau, das, mit Säurefuchsin gemischt, rein blau färbt, obgleich auch hier zunächst das Säurefuchsin vorfärbt.

Die Acidophobie des Nucleines ist noch nicht so gross, dass sie nicht durch Platin oder Osmium noch verstärkt werden könnte. In der That gibt Platinnuclein oder HERMANN'sche Gemischfällung in BIONDI's Lösung nunmehr eine reine Methylgrünfärbung, im Triacid stärker grüne Mischfarben. Chromirung des Nucleines setzt

das Methylgrün stark herab, wesshalb etwas röthere Mischfarben entstehen.

Diese Beobachtungen lassen sich ohne weiteres auf die Zellkerne übertragen, deren geringe Acidophobie ja auf dem Nuclein beruht. Aber nicht alles, was sich im Zellkern mit dem Dreifarbengemisch grün färbt, muss nun nothwendiger Weise Nuclein oder „Chromatin“ sein, nicht alles, was roth ist, darf ohne weitere Untersuchung vom „Chromatin“ ausgeschlossen werden, denn es müssten, wenn kleine und grosse Nucleingranulationen vorkämen, auch hier Doppelfärbungen nach dem Durchmesser entstehen. Ausserdem könnten auch andere Stoffe, vielleicht noch begünstigt durch ein Fixirungsmittel, sich electiv grün färben.

In bunten Bildern wenig Klarheit, viel Irrthum und ein Fünkchen Wahrheit — das ist das Signum dieser Gemischfärbungen, sobald man sie zur Bestimmung von Nuclein und Chromatin verwenden will. Am besten wird die Unsicherheit der Biondi'schen Färbungen durch die Controverse gekennzeichnet, die zwischen Korschelt (I, II) und Meves (I) über die Spinndrüsenkerne der Raupen geführt wird. Korschelt fand mit einer Mischung, die „bedeutend stärkeren Zusatz“ von Methylgrün enthielt (I, p. 517) als üblich, und nach geeigneter Differenzirung grössere Granulationen, seine Makrosomen, grün, kleinere roth gefärbt und hält die ersteren für das Chromatin (I, p. 526—529). Korschelt überfärbte zunächst mit der stark grünen Mischung den ganzen Kern grün und extrahirte dann mit Alkohol, der (I, p. 527) zunächst die kleinen Körner vom Grün befreite und sie roth erscheinen liess, schliesslich aber auch die rothe Grundfärbung der länger grün bleibenden Makrosomen enthüllte. „Man könnte somit auf die Vermuthung kommen, dass die Chromatintheile nur desshalb die grüne Farbe zurückhalten, weil sie umfangreicher sind, während sie aus den weit kleineren Körnchen leichter ausgezogen werden“ (I, p. 527). Korschelt hält diese Vermuthung zwar für beachtenswerth, aber doch nicht für richtig, weil die Grünfärbung der grossen Körner eine sehr distincte gegenüber den kleinen rothe sei und weil später, nach weiterem Auswaschen, die jetzt rothen Makrosomen höchst unbestimmt erscheinen. Die Mikrosomen hatten jetzt die Farbe ganz abgegeben.

Korschelt hat gar keine Biondi-Färbung angewendet, denn er hat überfärbt und zweitens differenzirt; alles, was er aber hierüber berichtet, ist nur der vollste Beweis für die von ihm selbst aufgestellte (I, p. 527), aber verworfene Vermuthung, dass physikalische Ursachen der Entfärbung zu Grunde liegen müssen. Würde man Albumosechromat mit stark grünem Biondi-Gemisch überfärben, so würde auch alles grün, und bei der folgenden Differenzirung würden zuerst die kleinen Granula das Grün fahren lassen und roth erscheinen, während die grossen noch intensiv grün wären. Später verlören sie auch das Grün, und die rothe Grundfarbe würde hervortreten, aber nur bei sehr glücklicher Unterbrechung der Differenzirung noch distinct roth, sondern abgeblasst und verwaschen, weil schon ein Theil des Roth während der Extraction des Grünes mit herausgelöst worden ist. Man würde also bei gewisser Differenzirung eines überfärbten Präparates gerade die umgekehrte Doppelfärbung erhalten als bei zeitiger Unterbrechung des Färbungsprocesses selbst.

Meyes (II, p. 576) benutzte die übliche Biondi'sche Mischung, ohne besonderen Zusatz von Methylgrün, und überfärbte nicht; so musste er nach dem oben Entwickelten die inverse Färbung von der Korschelt's bekommen, die grossen roth, die kleinen grün, genau wie die Albumose, vorausgesetzt natürlich, dass die fraglichen grossen und kleinen Granulationen der Spinndrüsenkerne sich sowohl mit Methylgrün, als auch mit Säurefuchsin färben. Das ist ja aber nach den Mittheilungen von Korschelt und Meves der Fall. Reine Nucleinsäure kann also das gesuchte Chromatin hier nicht sein. Alles, was die Untersucher mit der Methode feststellen können, sind Differenzen in der Grösse und dem Substanzreichthum, der Dichte der Kernelemente, und demgemäss musste der eine bei simultaner Doppelfärbung gerade zu umgekehrten Resultaten gelangen als der andere (Korschelt), der eine Combination der simultanen und der Differenzirungsfärbung benutzte. Das „Chromatin" konnten beide durch die Grünfärbung nicht herausfinden. Die ganze Streitfrage ist färbungsanalytisch überhaupt nicht zu lösen, zunächst ganz abgesehen von dem unbestimmten Begriff des „Chromatines", der zum guten Theil selbst mit der chemischen Theorie der Färbung steht und fällt.

6. Hämatoxylinlösungen.

An die Anilinfarben hätten sich noch Carmin und Hämatoxylin anzureihen, nur das letztere hat besonderes färbungstheoretisches Interesse und ist desshalb noch zu besprechen. Benutzt wurden Delafield's Lösung und Mayer's Hämalaun, beide in färbekräftigem Zustande von Grübler & Co. bezogen.

P. Mayer (II, III) hat ausführlich gezeigt, dass Hämatoxylin allein nicht färbt, sondern dass es eines Zusatzes eines anorganisches Salzes, unter denen das beliebteste das Alaun ist, bedarf, und dass nicht das unveränderte Hämatoxylin, sondern eines seiner Oxydationsproducte, das Hämatein, das färbende Princip aller gebräuchlichen Lösungen ist. Aehnlich wie die Carminsäure ist das noch nicht chemisch rein dargestellte Hämatein (vergl. Mayer, I, p. 315) als eine Säure aufzufassen, und dadurch rücken die Hämatoxylinfärbungen in eine Klasse mit den sauren Anilinfarben.

Mayer (I, p. 315) glaubt, dass das Alaun oder ein anderes Aluminoder Eisensalz mit dem Hämatein als Säure neue Farbsalze bildet, die mit dem Object, z. B. mit Nucleinsäure, zu einem gefärbten Doppelsalz sich verbinden und so chemisch die Färbung vermitteln. So verstehe ich wenigstens Mayer's (I, p. 316) Beispiel mit der Salmonucleinsäure. Die Bläuung der zunächst röthlichen Schnitte beim Abspülen mit schwachem Ammoniak soll nach Mayer (vergl. Lee und Mayer, I, p. 150) darauf beruhen, dass das Ammoniak die Thonerde ausfällt und dass davon das Hämatein mit niedergerissen wird. Ebenso soll das „in der Regel etwas alkalisch reagirende" Brunnen- oder Leitungswasser wirken. Da nun aber destillirtes Wasser ebenfalls die Schnitte bläut, so kann doch Mayer's Erklärung nicht zutreffen, die auch nicht das Rothbleiben gewisser Zellbestandtheile der Cyanophyceen etc. zu deuten gestattet. Bevor man die im Hämatein zu vermuthende Hämateinsäure noch nicht rein dargestellt hat, wird es nicht möglich sein, die Hämatoxylinfärbung genauer zu analysiren.

Einstweilen wird man sich damit begnügen müssen, auf die Theorie der sauren Indicatoren (vergl. Ostwald, I, p. 104; II, p. 799) hinzuweisen, die wohl auch auf das Hämatein übertragen werden muss. Wie das Methylorange einem Farbenwechsel unterliegt, wenn es aus dem Zustand der gebundenen Molekel (roth) in den des freien Säureiones (gelb) übergeht, so wird wohl auch die Hämateinsäure einen ähnlichen Umschlag von Blau nach Roth (freies Ion) geben. Oder sie könnte auch eine mehrbasische Säure sein und in den sauren Salzen anders gefärbt sein als in den neutralen.

Bleibt man bei der Indicatorentheorie stehen, so würde man die blauviolette Farbe der alkalischen Lösung des Hämateins so zu deuten haben, dass die Mischfarbe aus dem reinen Blau des nicht dissociirten Salzes und dem Roth der freien Säureionen sich zusammensetze. Durch Säurezusatz geht eine solche Lösung in reines Roth über, wohl dadurch, dass die schwache Hämateinsäure aus ihrem Salze verdrängt wird. Auch die rothviolette Farbe von Mayer's Hämatein oder Delafield's Lösung würde einer solchen Mischung freier und gebundener Säure zuzuschreiben sein.

Die rothe Färbung der noch nicht mit Wasser gespülten Schnitte käme bei einer solchen Auffassung daher, dass die freie Farbsäure oder vielleicht ein saures Salz färbt, die an die Gegenwart eines Alaunüberschusses gebunden sind. Wird dieser durch Wasser entfernt, so entsteht das blaue geschlossene Salz, und nur dort, wo sehr substanzreiche Theile das Alaun neben dem Farbstoff sehr festhalten, erhielt sich auch die rothe, „metachromatische“, sog. saure Färbung. Ich habe schon früher eine ähnliche Erklärung gegeben (III, p. 9).

P. Mayer (I, p. 321) meint, dass ich zu anderen Resultaten gekommen sein würde, wenn ich seinen Hämalaun statt der Lösung Delafield's benutzt hätte. Das habe ich nachgeholt, aber mit gleichem Erfolg wie früher. Dasselbe Object wie damals (III, p. 9, Taf. II, Fig. 43, 44), Alkoholmaterial von Oscillaria Froehlichii, färbte sich mit Mayer's Hämalaun zunächst rein roth; schon kurzes Abspülen mit Wasser genügte, um bis auf einige roth bleibende Körner alles in Blau umzufärben. Verfolgt man unter dem Mikroskop die Diffusion von Mayer's Hämalaun, so sieht man, dass zuerst ein blauer Vorschub kommt, dem bald das Roth folgt. Durch die Verdünnung des Alaunes mit Wasser an der Diffusionsgrenze werden zunächst blaue Salzmolekel gebildet, denen aber bald, gehalten von dem Alaun, die rothe Lösung der freien Farbsäure folgt.

Speichert ein Object, z. B. die grossen Granula eines Albumosechromates, sogleich von dem zuerst herantretenden Blau, so bleiben sie auch bläulicher als die erst später mit dem Roth sich beladenden kleineren Granula; eine Art von Metachromasie ist die Folge. Wäscht man später mit Wasser aus, so bläuen sich die grossen Granula noch mehr und reiner, aber auch die kleinen verlieren ihre rein rothe Färbung und werden bläulich. Die schwache Metachromasie erhält sich aber doch, wieder an Granulis desselben chemischen Körpers.

Viel längeres Auswaschen verlangt die Nucleinsäure, damit ursprünglich roth gefärbte Fällungen sich bläuen. Eine Stunde genügte bei dem Platinniederschlag der Thymusnucleinsäure. Dass die rothe, „saure“ Färbung auch hier ganz verschwindet, zeigt am besten der rein physikalische Antheil der Nucleinsäure an der Färbung. Das er-

sieht man auch noch aus Folgendem. Granula aus Nucleinsäure ($PtCl_4$) oder Deuteroalbumose (gefällt mit Formaldehyd oder Kaliumbichromat), mit Mayer's Hämalaun gefärbt und durch Wasser gebläut, werden von Salzsäuredämpfen sofort rein roth, über Ammoniak wieder blau u. s. w. Man nehme hierzu nur feuchte Präparate aus Gründen, über die man p. 184 nachlesen wolle, wo auch Versuche mit Anilinfarben besprochen sind. Das Hämatein reagirt also ganz gleichartig, unabhängig davon, ob es in Granula der Nucleinsäure oder der Albumose, eines neutralen Körpers, eingelagert ist. Chemische Verbindungen zwischen dem Hämatein und dem gefärbten Object können unter solchen Umständen nicht vorausgesetzt werden. Auch die Hämatoxylinfärbungen sind, wie die anderen, physikalische Einlagerungen und gehören zu den Gemischfärbungen. Wie das Hämatoxylin verhält sich das Orcein, das in essigsaurer Lösung zunächst den ganzen Schnitt dunkel-weinroth färbt (Israel, I, p. 172) und bei Differenzirungen theils roth bleibt, theils nach Blau umschlägt. Eigene Versuche fehlen mir, doch dürfte auch diese Metachromasie des Orceines, ähnlich wie beim Hämatoxylin, auch ohne die chemische Theorie der Färbung erklärbar sein.

Kapitel VI. Umstimmung und Vernichtung des Färbungsvermögens durch Imprägnation.

Um die physikalische Theorie der Färbung, die durch die vorausgehenden Versuche schon vollständig gesichert erscheint, noch fester zu begründen, waren die Mittel aufzusuchen, mit denen die Granula partiell oder total verstopft und so theilweise oder ganz unfärbbar gemacht werden könnten. Die Imprägnirungsstoffe waren so zu wählen, dass ihre chemischen Beziehungen zu den Eiweisskörpern einerseits, den Farblösungen anderseits entweder schon bekannt waren oder leicht in ihren Grundzügen festgestellt werden konnten. Wenn es gelang, durch Einlagerung eines Stoffes, der chemisch die Granula nicht verändert und auch den Farbstoffen gegenüber indifferent ist, die Färbung zu unterdrücken, so wäre damit ein neuer Beweis für die Adsorptionstheorie erbracht worden. Denn der Platz, den sonst die Farbstoffe einnehmen, wäre durch einen harmlosen Körper versperrt, und das könnte nur auf einer Sättigung mechanischer Affinitäten beruhen. Die Vernichtung des Färbungsvermögens, die so erreicht werden kann, ist freilich nicht absolut und gilt zunächst nur für die gleiche Färbzeit und bei gleicher Temperatur. Durch Verlängerung der ersteren wird wenig erreicht, dagegen kann aber durch Steigerung der letzteren das Färbungshinderniss ganz überwunden werden, hauptsächlich dadurch, dass der eingelagerte Stoff durch die heisse Farblösung herausgelöst wird und ihr so den Platz überlässt. Für die theoretische Betrachtung ist die Unterdrückung der Färbung unter den üblichen Bedingungen schon vollkommen ausreichend, ja sie wird gerade dadurch, dass sie selbst wieder aufgehoben werden kann, besonders beweiskräftig.

Statt das Färbungsvermögen vollkommen zu vernichten, wurde auch versucht es umzustimmen, die Chromatophilie zu verschieben. Als Hauptaufgabe wurde es

betrachtet, die Acidophobie der Nucleinsäure zu beseitigen, was in der That durch Imprägnirung mit Albumose gelang.

Zur Einlagerung eignen sich nicht alle Stoffe, da nicht alle adsorbirt werden, und ein Stoff, der die Albumosegranula leicht verstopft, ist vielleicht auf die Nucleinsäure ohne Einfluss.

Erfolge wurden erzielt durch Imprägnirung mit Fixirungsmitteln, mit Amidokörpern, Tannin, Albumose und Nucleinsäure, während es nicht gelang, anorganische Salze und in Wasser unlösliche Stoffe in die Granula einzulagern.

Anorganische Salze, in Wasser löslich, wie Soda, Alaun, Salpeter, Kochsalz, Kupfersulfat, wurden in 20 Stunden nicht adsorbirt, die Granula färbten sich ungeschwächt. In Wasser unlösliche Salze in den Granulis niederzuschlagen, gelang aus demselben Grunde nicht: die löslichen Componenten, wie Chlorbayrum zur Erzeugung von Schwerspath und oxalsaurem Baryt oder Chlorcalcium für Gips, werden weder aus starken noch aus schwachen Lösungen adsorbirt, ebensowenig Schwefelsäure oder oxalsaures Ammon. Auch konnte nichts erreicht werden, als die Objecte 5 Minuten in Chlorbaryum, darauf ohne Abspülung 5 Minuten in entsprechende Schwefelsäure, dann wieder in Chlorbaryum gelegt wurden und dieser Turnus eine Stunde lang fortgesetzt wurde. Das Färbungsvermögen war weder geschwächt, noch verändert.

Wird aber eine Componente adsorbirt, so gelingt auch die Verstopfung z. B. mit Chromgelb. Legt man Granula aus Platinalbumose 3 Stunden in 2,5-proc. Kaliumbichromat und dann in Bleiacetat, so sieht man, dass sie partiell mit Bleichromat imprägnirt sind. Dem entspricht auch eine deutliche Abnahme der Färbkraft, die in den grossen Granulis nahezu an die totale Verstopfung heranreicht. Einige organische Stoffe, wie Glycerin, Harnstoff, Rohrzucker, wurden von den Nucleinsäuregranulis ebenfalls nicht adsorbirt.

In Wasser unlösliche Substanzen, wie Naphthalin und Ricinusöl, in concentrirter alkoholischer Lösung, 5 Proc. Schwefel in Schwefelkohlenstoff wurden weder von den trockenen Granulis der Albumose, noch denen der Nucleinsäure adsorbirt. Das Ricinusöl war gar nicht in die Granula eingedrungen, denn Osmiumsäure, die daneben liegende Oeltröpchen sofort schwärzte, färbte die Granula gar nicht. Der Uebereinstimmung halber sei darauf hingewiesen, dass nach Weppen (I, p. 243) Schwefel aus Lösungen in Alkohol oder Terpentinöl auch in die Kohle nicht aufgenommen zu werden scheint.

1. Imprägnirung mit Fixirungsmitteln.

Im Anschluss an die bereits mitgetheilten Versuche über die Färbung nicht ausgewaschener Fällungen war jetzt der umgekehrte Weg zu betreten: vollständig ausgewaschene Granula mit bestem Färbungsvermögen wurden auf Deckgläser angetrocknet, 20 Stunden in die Fixirungsmittel eingelegt, kurz in Wasser abgespült, um die äusserlich anhaftenden Lösungen zu entfernen, und nun gefärbt. Als Testobjecte dienten Platinalbumos [40-proc., (1 + 10) $PtCl_4$], gefärbt mit Methylgrün-Fuchsin und Albumosechromat (40-proc. mit 2,5-proc. Kaliumbichromat), dessen Färbungsvermögen an Ehrlich's Triacidgemisch gemessen wurde. Die Färbzeit bei Zimmertemperatur war

8 Minuten im ersten Falle, beim Triacid 4; dann wurde in Wasser abgespült, getrocknet und in Balsam eingeschlossen.

Tabelle I. Imprägnirung von Fixirungsmitteln.

No.	Imprägnirungsmittel 20 Stunden, kurz gespült	Platinalbumose, Methylgrün-Fuchsin 8 Minuten		Chromatalbumose, Triacid 4 Minuten	
		grosse Granula	kleine Granula	grosse Granula	kleine Granula
1	Alkohol	blaugrün	roth	roth	violett
2	Alkohol-Chloroform-Eisessig (VAN GEHUCHTEN)	„	„	„	„
3	Formaldehyd 4-proc.	„	roth mit bläulichem Stich	gelbroth	roth, nicht violett
4	Salpetersäure 50-proc.	„	desgl.	roth	roth, nicht neutrophil
5	Pikrinsäure 0,5-proc.	blass blaugrün	desgl.	gelb u. gelbroth	violett
6	Chromsäure 0,5-proc.	farblos	desgl.	gelbroth	roth, nirgends violett
7	Kaliumbichromat 2,5-proc.	farblos oder sehr blassbläulich	desgl.	„	desgl.
8	Sublimat 3-proc.	blaugrün	roth	„	roth, oft leicht violett angehaucht
9	Platinchlorid 1-proc.	„	roth, theils bläulich-roth	farblos	blassroth, nie violett
10	Osmiumsäure 1-proc.	farblos	farblos	„	farblos
11	ALTMANN's Gemisch	„	blass, röthlich-blau	„	blassröthlich
12	FLEMMING's „	„	desgl.	schwach gelbroth	blassroth
13	HERMANN's „	„	desgl.	farblos	blassröthlich
14	Jodalkohol	„	farblos	„	farblos

Die Tabelle bestätigt, geringe Schwankungen abgerechnet, das, was über die Farbfeindlichkeit der Fixirungsmittel bereits festgestellt wurde (p. 85). Fast indifferent ist neben Alkohol, Formaldehyd, Salpetersäure und Sublimat auch die Pikrinsäure, obgleich die Granula deutlich gelb aussahen. Die Chromverbindungen haben sich, wie früher, partiell farbfeindlich gegen Methylgrün erwiesen. Osmiumsäure und ihre Gemische, ebenso Jodalkohol haben die grossen Granula ganz abgesperrt, Osmiumsäure und Jodalkohol auch die kleinen, während diese bei No. 11—13 noch schwach sich färbten.

Interessant sind die Adsorptionsverhältnisse der Granula für das eigene Fixirungsmittel, Platinalbumose ist durch Platinchlorid kaum (No. 9), das Albumosechromat durch die Chromverbindungen (No. 6 und 7) deutlich verändert. Stark hat dagegen Platinchlorid auf das Chromat gewirkt. Die vom ersten Fixirungsmittel dem Niederschlag ertheilte secundäre Adsorption äussert sich nicht bloss den Farben, sondern auch dem zweiten zur Imprägnation benutzten Fixirungsmittel gegenüber. Aehnliche Beispiele bietet die Adsorption solcher Kohle, die schon adsorbirt hat.

Weppen (II, p. 355) fand, dass Kohle, die bereits ein Metall aufgenommen hat, auch noch ein anderes fällen kann, auch wenn „man eine andere Reihenfolge beobachtet als die, in welcher ein Metall das andere niederzuschlagen pflegt". Hier waren ebenfalls chemische Processe ausgeschlossen, es wirkte nur die mechanische Affinität. Eine mit Sublimatlösung ganz gesättigte Kohle schlug z. B. reichlich schwefelsaures Eisenoxydul nieder, dann Kupfersulfat, nun wieder Sublimat etc.

Nach dem Auswaschen der imprägnirten Fixirungsmittel ist die Chromatophilie der Testobjecte ungeschwächt zurückgekehrt, um so schneller, je geringer sie verändert war.

Granula aus Thymusnucleinsäure (10-proc. $PtCl_4$) wurden vom Formaldehyd gar nicht gestört, dagegen vom Platinchlorid (10-proc. 20 Stunden) gegen alle basischen Farben vollkommen verstopft. Auch Sublimat drückte das Färbungsvermögen so stark herab, dass Methylgrün und Gentiana eben nur noch mit zartem Hauch anfärben konnten. Die Acidophobie war stets ungeschwächt. Man achte auf die von der Albumose abweichenden Verhältnisse. Die Platinfällung nimmt noch Platinchlorid bis zur vollen Verstopfung auf, und auch das sonst indifferente Sublimat wirkt energisch.

Hieraus wolle man aber nicht folgern, dass die Platinverbindung der Nucleinsäure ein stärkeres Adsorptionsvermögen habe als die der Albumose, stärkere mechanische Affinitäten entwickele als diese letztere. Vielmehr ist gerade das Umgekehrte richtig. Je weniger mechanische Affinitäten überhaupt abgesättigt werden müssen, um so leichter muss auch die totale Verstopfung schon mit solchen Stoffen gelingen, die nur in geringer Menge adsorbirt werden. Selbst wenn also das Platinchlorid von der Nucleinsäure nicht reichlicher adsorbirt würde als von der Albumose, könnte doch in einem Falle eine volle Absättigung eintreten, im anderen ein zur Färbung noch ausreichender ungesättigter Rest mechanischer Affinitäten übrig bleiben. Allgemeinere, auch diese Frage berührende Betrachtungen über das primäre Adsorptionsvermögen sollen den zweiten Theil beschliessen.

2. Imprägnirung mit Amidokörpern.

Asparagin (1-proc.), Leucin (0,2-proc.), Glycocoll (5-proc.) geben im Reagensrohre weder mit basischen noch sauren Farbstoffen innerhalb 20 Stunden irgend welche Fällung; auch keine Verfärbung oder sonst ein Anzeichen einer bestehenden chemischen Beeinflussung ist bemerkbar. Man wird daher wohl diese Amidokörper in Rücksicht auf den Färbeprocess chemisch als indifferent gegenüber den Farben ansehen dürfen. Schwieriger ist die Frage zu entscheiden, ob auch die Platinfällungen der Deuteroalbumose und der Nucleinsäuren in den Lösungen der genannten Amidoverbindungen chemisch gar nicht beeinflusst werden und eine Vernichtung des Färbungsvermögens durch sie allein auf ihre Adsorption zurückgeführt werden darf. In den bekannten Lehrbüchern der physiologischen Chemie war nichts darüber zu finden, ob die Eiweisskörper in Lösungen mit den Amidokörpern sich verbinden. Dagegen lässt sich hierüber wohl eine Ansicht aus der Thatsache ableiten, dass diese Stoffe bei der Fäulniss oder künstlichen Zersetzung der Eiweisskörper regelmässig entstehen. Hieraus ist wohl zunächst zu folgern, dass Amidogruppen am Aufbau der

Eiweissmolekel theilnehmen, was um so wahrscheinlicher dadurch wird, dass das Asparagin in den Pflanzen zur Synthese von Eiweiss vielfach dient. Sind also Amidoreste bereits im Eiweissmolekel enthalten, so ist es wenig wahrscheinlich, dass die fertige Verbindung noch weiterhin mit Amidokörpern chemisch sich vereinigen würde. Noch weniger wahrscheinlich endlich ist es, dass die unlöslichen Metallverbindungen, die wir in den Granulis aus Albumose oder Nucleinsäure benutzen, zu chemischen Verkettungen mit den Amidokörpern befähigt sein könnten. Diese können also wohl als chemisch indifferente Imprägnirungsmittel in unsere Beweisführung aufgenommen werden.

Das Färbungsvermögen der Platinalbumose wird durch 20-stündige Imprägnirung mit Asparagin (1-proc.) oder Leucin (0,2-proc.) gar nicht verändert, durch Glycocoll (5-proc.) nur wenig geschwächt.

Viel zugänglicher für das Glycocoll ist die Nucleinsäure, aber nur dann, wenn ihre Granula wirklich ganz unlöslich in Wasser sind, wie z. B. die Platingranula der Thymusnucleinsäure, die selbst einstündiges Erhitzen auf dem kochenden Wasserbad ohne Spur der Lösung überstehen (vergl. auch p. 104). Die Chrom- und Platinfällungen der Hefenucleinsäure (p. 43) waren nicht so vollkommen unlöslich, und bei ihnen versagte auch die Glycocollimprägnation, sicher nur desshalb, weil die Adsorptionskraft dieser nicht so festen Fällungen geringer war als bei der Thymusnucleinsäure. Deren Unlöslichkeit als eine besondere Eigenthümlichkeit aufzufassen, halte ich nicht für richtig; sie beruht vielmehr sicher darauf, dass mit 10-proc. Platinchlorid gefällt wurde, die Hefennucleinsäure aber nur mit 1-proc. Neue Versuche müssten hier entscheiden.

Die Granula der Thymusnucleinsäure werden von 0,2-proc. Leucin, 1-proc. Asparagin nicht verstopft, aber wohl durch 5-proc. Glycocoll 20 Stunden kalt imprägnirt. Fuchsin, Safranin, Methylgrün, Gentiana, Triacid und Biondi's Lösung, alle 10 Minuten wirkend, also unter Bedingungen für die intensivste Färbung, färben jetzt nicht mehr. Eine mir unerklärliche Ausnahme bildet nach meinen Notizen das Methylenblau, es färbt schwächer, aber doch noch recht gut. Abgesehen von diesem, weiterer Controle bedürftigen Falle, ist aber für alle anderen basischen Farben, die sonst mit grosser Gier aufgenommen werden, der Weg vollkommen versperrt. Auch die sauren Farben, die im triaciden Gemisch Ehrlich's und in dem Biondi's dargeboten werden, sind wirkungslos geblieben.

Wäscht man das Glycocoll $^1/_2$ Stunde lang in heissem Wasser aus, so färbt z. B. Safranin schon wieder recht gut, aber noch nicht optimal. Wird 20 Stunden mit kaltem Wasser gewaschen, so ist das volle Färbungsvermögen z. B. gegenüber Safranin oder Methylgrün zurückgekehrt.

3. Imprägnirung mit Tannin.

Das Tannin wird, ebenso wie das Glycocoll, von den Platingranulis der Albumose und der Thymusnucleinsäure nicht in gleichem Maasse adsorbirt, sehr begierig von der ersteren, schwieriger von der letzteren. Zunächst ist auch wieder zu entscheiden, ob chemische Affinitäten das Tannin fest-

halten, das ein nie versagendes Fällungsmittel für Eiweisskörper aller Art ist und mit ihnen salzartige Verbindung oder complicirte Doppelverbindungen bildet. In allen diesen Tannaten ist die Gerbsäure durch die bekannten Reagentien nachweisbar. Die granuläre Tanninfällung der Albumose ist im Ueberschuss etwas löslich und verschwindet in 0,2-proc. Natronlauge augenblicklich. Im kalten Wasser löst sie sich nur sehr schwer, von concentrirter Salzsäure wird sie schon in 5 Minuten zu unschönen Massen und Klümpchen deformirt und dabei theilweise gelöst. Die mitgetheilten Eigenschaften des Albumosetannates werden ausreichen, um zu zeigen, dass die Einlagerung des Tannines in die Platinalbumose doch nur auf Adsorption beruhen kann. Denn wenn eine chemische Umsetzung in der Weise stattfände, dass ein Theil der Platinalbumose in Tannat umgewandelt würde, dann müsste doch dieser Theil sicher in Natronlauge sich lösen. Infolgedessen müssten die Granula theilweise schwinden, aufgelockert oder angefressen aussehen, wenn sie mit Lauge behandelt worden sind. Auch ihr Färbungsvermögen müsste gelitten haben. Davon ist nichts zu sehen. Die durch Tanninimprägnation ganz unfärbbar gewordenen Granula der Platinalbumose gehen aus der Laugebehandlung vollkommen ungeschädigt hervor und haben ihre frühere Chromatophilie ungeschmälert wiedererlangt.

Die Tanninfällung einer 40-proc. Deuteroalbumose färbt sich, wenn nicht ausgewaschen wird, weder mit sauren noch basischen Farben (p. 85), nimmt aber sie alle reichlich auf, sobald durch gründliches Auswaschen das überschüssige, nicht chemisch gebundene, sondern nur adsorbirte Tannin entfernt worden ist. Trotzdem dass die basischen Farbstoffe von Tannin als unlösliche Tannate gefällt werden, worauf auch der Tanninnachweis mit Methylenblau beruht, färbt sich damit die nicht ausgewaschene Tanninfällung der Albumose nicht. Doch nur desshalb, weil das in den Granulis adsorbirte Tannin den Platz versperrt, so dass die Anilinfarben gar nicht eindringen können. Desshalb ist es auch unmöglich, das in die Platin- oder Chromatalbumose eingelagerte Tannin mit Methylenblau nachzuweisen, die Granula bleiben selbst bei 3-stündiger Einwirkung der Farblösung ganz farblos. Leicht gelingt es dagegen, das imprägnirte Tannin durch Osmiumsäure, Eisenchlorid oder Kaliumbichromat chemisch nachzuweisen, wobei die grossen Granula stets viel tiefer gefärbt sind als die kleineren. Der Unterschied gegenüber den basischen Farbstoffen ist sehr beachtenswerth. Ihm gegenüber versagt das imprägnirte Tannin, obgleich es doch, wie die anderen eben genannten Reagentien zeigen, chemisch vollkommen reactionsfähig ist. Die Ursache kann also nicht in chemischen, sondern nur in physikalischen Bedingungen zu suchen sein, die der Osmiumsäure, dem Eisenchlorid und Kaliumbichromat den Eintritt in die Granula unbehindert gestatten, die basischen Farbstoffe aber absperren. Da die Diffusionsgeschwindigkeit dem osmotischen Drucke proportional ist und dieser selbst als Funktion des Molekulargewichtes immer kleiner wird, je höher dieses ist, so werden die drei anorganischen Reagentien auf Gerbstoff mit viel mehr Beschleunigung gegen die Granula angetrieben als das Methylenblau. Die ersteren werden daher den Widerstand, den die Granula ihrer Diffusion durch sie hindurch darbieten, glatt überwinden

und so bei ihrem Weg durch die Granula auch chemisch mit dem hier imprägnirten Tannin sich verbinden. Anders die mit geringerer Kraft sich bewegenden Molekel des Methylenblaues oder eines anderen basischen Farbstoffes, sie bedürfen, um in die Granula einzudringen, noch deren Unterstützung durch die mechanischen Affinitäten, durch die Adsorption, weil ihre Kraft zu gering ist, um allein durch ihren osmotischen Druck die Diffusion durch die Granula fortzusetzen. Sind deren Adsorptionskräfte bereits durch Einlagerung anderer Stoffe gefesselt, z. B. durch das Tannin, so fehlt dem herandiffundirenden Methylenblau die granuläre Anziehung, und die Färbung unterbleibt. Durch Sättigung der mechanischen Affinität in den Granulis verhindert also das imprägnirte Tannin die Färbung, nicht dadurch, dass es neue chemische Verbindungen erzeugt, die keine chemische Verwandtschaft zu den Farbstoffen haben. Denn selbst wenn die Platin- und Chromatalbumose theilweise oder ganz in Albumosetannat umgewandelt würde, so müsste doch dieses sich färben, genau so, wie die ausgewaschene Tanninfällung der Albumose sich färbt. Dass das nicht geschieht, beruht nur darauf, dass das Tannin die mechanischen Bedingungen der Färbung aufhebt, indem es selbst adsorbirt wird.

Kein einziger Farbstoff wird von den Albumosegranulis aufgenommen, wenn sie 20 Stunden mit 2-proc. Tannin imprägnirt und kurz in destillirtem Wasser abgespült worden sind. Die einzige Ausnahme bildet die viel schneller diffundirende Pikrinsäure, die noch schwach gelb färbt. Die tannirten Präparate erscheinen dem blossen Auge nach der Färbung intensiv gefärbt, die mikroskopisshe Untersuchung zeigt aber, dass die Granula selbst vollkommen farblos sind, dass nur zwischen ihnen und an ihrer Oberfläche Farbstoff ausgeschieden worden ist. Man könnte annehmen, dass durch diese Ausfällung der Farbstoffe ihnen der Weg ins Innere verlegt würde und dass dadurch allein das Tannin wirkt. Eine solche Erklärung hätte aber nur für die basischen Farbstoffe einen Schein von Berechtigung, denn sie allein werden von dem Tannin gefällt. Die sauren dagegen werden nicht gefällt und trotzdem färben sie nicht. Wieder ein weiterer Beleg dafür, dass die oben versuchte Erklärung der Färbungsverhinderung allein richtig sein kann. Hierzu noch folgende Tabelle, die keiner weiteren Bemerkung mehr bedarf.

Tabelle II. Verstopfung der Albumosegranula mit 2-proc. Tannin.

Imprägnirung 20 Stunden, kurzes Spülen mit destillirtem Wasser; Färbezeit 10 Minuten, Zimmertemperatur. Alle Farbstoffe 0,1-proc.
0 = ungefärbt. — = nicht geprüft.

40-proc. Deuteroalbumose granulär gefällt mit	Lichtgrün	Indulin	Säurefuchsin	Eosin	Safranin	Methylgrün	Methylenblau	Triacid	Fuchsin-Methylgrün
1) 2,5 Kaliumbichromat	—	0	0	0	0	—	0	0	—
2) Platinchlorid (1+10) Proc.	—	—	0	—	0	0	0	—	0
3) Formaldehyd, 10 Proc.	0	0	0	0	0	0	—	—	—

Schon ein viel kürzerer Aufenthalt in der Tanninlösung genügt, um die Granula gänzlich zu verstopfen, die Testobjecte für Triacid (No. 1) und für Methylgrünfuchsin (No. 2) färben sich bereits nicht mehr, wenn sie 15 Minuten in 2-proc. Tannin gelegen haben, schon nach 5 Minuten ist dieser Zustand nahezu erreicht. Langsamer kehrt beim Auswaschen mit kaltem Wasser das Färbungsvermögen zurück, nach 20 Stunden langem Liegen in öfters gewechseltem destillirten Wasser ist bei den Objecten No. 1 und 2 der Tabelle II noch nicht die Chromatophilie erwacht, in Methylgrün-Fuchsin resp. Triacid herrschen matte Mischfarben vor. Auch $^1/_2$ Stunde heisses Wasser genügt noch nicht, sicher aber kehrt nach seiner 2-stündigen Wirkung die Chromatophilie vollkommen zurück. Viel schneller ist der alte Zustand herbeizuführen durch schwache Lauge, schon 5 Minuten lange Behandlung mit 0,02-proc. Natronlauge stellt die alte Chromatophilie vollständig wieder her, 0,002-proc. wirkte in so kurzer Zeit nicht mehr. Stärkere Natronlaugen (0,2- und 2-proc.) verändern Form und Aussehen der Granula gar nicht und rufen innerhalb 5 Minuten das Färbungsvermögen natürlich ebenfalls zurück, nur durch Herauslösung des Tannines, nicht etwa, wie vielleicht hartnäckige Verfechter der chemischen Färbungstheorie einwenden könnten, allein durch seine Neutralisation. Denn dasselbe erreicht man auch durch concentrirte Salzsäure, die sogar ein Fällungsmittel für Tannin ist und das auch darin zu erkennen gibt, dass sie $^1/_2$ verdünnt auch in 20 Minuten keine Wirkung hat. Nur die concentrirte entfernt die Färbung hindernde Gerbsäure fast vollständig in 5 Minuten, gänzlich in 10 Minuten, wohl dadurch, dass sie durch ihre Fällungskraft zunächst das Adsorptionsvermögen der Granula überwindet und ihnen die Gerbsäure entreisst. Dadurch wird diese leichter auswaschbar und gleichzeitig mit dem Abspülen der Salzsäure entfernt. Wie auch immer die imprägnirte Gerbsäure fortgeschafft wird, immer kehrt die alte Chromatophilie ungeschwächt und unverändert zurück.

Die Nucleinsäure wird nicht so leicht durch 2-proc. Tannin verstopft, das nach 20 Stunden noch sehr ungleichmässige Resultate gibt, ein grosser Theil der Granula färbt sich z. B. mit Safranin gar nicht mehr, ein anderer schwach und ein kleinerer Rest noch ganz intensiv. Ungefähr der gleiche Grad der Verstopfung wird schon nach 2—3 Stunden erreicht, während nach 15 Minuten noch allgemeine intensive Färbung eintritt. Bei der Albumose genügte schon diese kurze Wirkung, um völlig zu verstopfen. Das wird man mit 2-proc. Tannin bei der Nucleinsäure überhaupt nicht erreichen. Selbst eine 10-proc. Lösung der Gerbsäure hat in 2—3 Stunden noch keinen vollen Erfolg, die Granula sind immer noch schwach farbig angehaucht oder ungleichmässig, wie bei 2-proc., gefärbt. Eine 20-stündige Imprägnation mit 10-proc. Tannin vernichtet aber doch auch das Färbungsvermögen vollkommen und ruft auch nicht etwa Neigung für die sauren Farbstoffe hervor.

Wird die aus Granulis und Gerinnseln bestehende Fällung der Thymusnucleinsäure (1 + 10)$PtCl_4$, 20 Stunden mit 10-proc. Tannin imprägnirt, so färben sich die Granula mit Safranin gar nicht mehr, mit Biondi's oder mit Methylgrün-Fuchsin-Gemischen erhalten sie einen ganz blassen Hauch, während die Gerinnsel durchweg stark gefärbt sind. Genau wie die Farbstoffe wird auch das Tannin von

den Granulis viel mehr gespeichert als von den Gerinnseln und verstopft infolgedessen die ersteren vollständig, während die letzteren noch gut sich färben.

Diese Beobachtungen erinnern an die Angaben von RAWITZ über seine adjective Färbung nach Vorbehandlung mit Tannin-Brechweinstein (I, p. 76), nach der ebenfalls die substanzreichen und grösseren Elemente der Zelle, wie die Chromosomen, mit Safranin, Fuchsin etc. sich nicht mehr färben, wohl aber das zarte Protoplasma, die Spindelfasern u. dergl. Diese von RAWITZ sogen. Inversion beruht auf weiter nichts als auf der Absättigung der mechanischen Affinitäten durch Tannin, genau wie in unseren Versuchen mit den verschiedenen Granulis. Da die gradweise Einlagerung des Tannines und die damit gegebene Vernichtung des Färbungsvermögens genau nach denselben physikalischen Bedingungen erfolgt, wie die Aufnahme der Farbstoffe selbst, so bietet die von RAWITZ empfohlene Methode gegenüber der unmittelbaren Färbung gar keinen Vortheil, weil sie zu keinen anderen Schlüssen berechtigt als diese auch.

Die von RAWITZ mitgetheilten Resultate an histologischen Objecten ergänzen unsere Granulaversuche und ersparen uns, weitere Beispiele anzuführen.

4. Imprägniruug von Nucleinsäure in Albumosegranula.

Die streng acidophoben Eigenschaften der Hefenucleinsäure (1-proc. wässrige Lösung) durch Imprägnation auf die Albumosegranula zu übertragen, gelingt nicht, selbst in 20 Stunden nicht. Das Albumosechromat färbt sich ungeschwächt mit sauren Farben. Ganz unterbleibt jedoch die Adsorption nicht, denn Methylgrün, das ja vom Chrom ganz unterdrückt war, färbt nunmehr die Granula äusserst intensiv. Die Menge der aufgenommenen Nucleinsäure genügt aber nicht, um die Granula acidophob zu machen, während es umgekehrt leicht ist, durch Albumoseimprägnation die Acidophobie der Nucleinsäuregranula ganz aufzuheben. Dass hier nicht reciproke Wirkungen zu erzielen sind, braucht nicht in Erstaunen zu setzen, denn das active Adsorptionsvermögen der Nucleinsäuregranula gegenüber Albumoselösung kann ein ganz anderes sein als das passive Adsorptionsvermögen der Nucleinsäure gegenüber Albumosegranulis. Das Chrom gibt nicht den Ausschlag, denn auch die Granula aus Platinalbumose werden durch Nucleinsäurebehandlung nicht total acidophob und färben sich wie vorher.

5. Imprägnirung von Albumose in Nucleinsäuregranula.

Alle bis jetzt behandelten Imprägnationsmittel leiden, trotz der schönen Erfolge, die sie theilweise gebracht haben, an einem Mangel: sie lassen sich nicht in den Granulis durch weitere Behandlung unlöslich festhalten, sie sind alle mehr oder weniger leicht auswaschbar. Das Tannin lässt sich zwar chemisch intragranulär ausfällen, erzeugt aber so dunkle und intensive Farben, dass die Granula für weitere Versuche unbrauchbar werden. Nur die Albumose kann man

secundär in den Granulis ausfällen, ohne die genannten Nachtheile. Am bequemsten ist es, die Granula auf dicken Deckgläsern anzutrocknen und nun 20 Stunden lang bei Zimmertemperatur in eine 1- oder 5-proc. Albumoselösung zu legen; eine heisse Lösung imprägnirt schon in $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde. Auf diese Weise lässt sich die deutliche Acidophobie der Osmium- und Platinalbumose ganz beseitigen, Lichtgrün, Säurefuchsin, Indulin etc. färben jetzt optimal. Dass wirklich nur die intragranulär festgehaltene Albumose die Färbung steigert, erkennt man leicht daran, dass auch längeres Spülen mit Wasser, das alle äusserlich anhängende Albumose sicher entfernt, den Erfolg nicht stört.

Die eingelagerte Albumose kann man durch beliebige Fixirungsmittel secundär fixiren und dadurch die Granula substanzreicher und dichter machen; die hieraus erwachsenden Hindernisse können durch viel längere Färbzeit oder besonders durch Erhitzen überwunden werden.

Zahlreiche Versuche mit Albumosegranulis übergehe ich, um die interessantesten mit der Nucleinsäure um so ausführlicher zu behandeln. Nur sei kurz erwähnt, dass die Granula aus Chrom- oder Platinalbumose durch nachfixirte Albumose noch mehr verdichtet und daher für Spiegelfärbungen besonders geeignet werden. Nach Färbung mit Ziehl's Carbolfuchsin kann man mehrere Minuten mit 5-proc. Schwefelsäure behandeln, ohne die Spiegelfärbung zu entfernen, ja es bedarf sogar einer längeren Säurewirkung, um den Rand der Granula zu entfärben (Taf., Fig. 28).

Altmann hat bereits in der ersten Mittheilung über die Nucleinsäure (V, p. 525) erwähnt, dass sie in saurer Lösung auch Albumose fälle. Die Thymusnucleinsäure gibt nach Kossel (I, p. 80) und Neumann in essigsaurer Lösung mit Eiweiss und Albumose Niederschläge, die in Salzsäure schwer oder gar nicht löslich sind. Genauer wurde diese Albumoseverbindung der Thymusnucleinsäure von Milroy (I) studirt, der die Bindung beider als eine feste, ähnlich wie in Pankreasnuclein zwischen Nucleinsäure und Albumin bezeichnet (I, p. 313). Die gelöste, freie Nucleinsäure ist es, die jene Verbindungen eingeht, die sicher nicht entstehen werden, wenn eine ganz unlösliche Platinfällung der Nucleinsäure mit einer nahezu neutralen Albumoselösung zusammengebracht wird.

Dass ihre Einlagerung nur auf Adsorption beruht und nicht von den chemischen Einwirkungen herzuleiten ist, die man im Reagensrohr beobachtet hat, geht wohl am besten daraus hervor, dass Serumalbumin nicht in die Nucleinsäuregranula aufgenommen wird. Nucleinsäure fällt auch Albuminlösungen und erzeugt damit Nucleoalbumine, Doppelverbindungen, die nach Lilienfeld (I, p. 394) um so besser auch mit sauren Farben sich färben, je mehr Albumin angegliedert ist (vergl. auch p. 95). Ebenso, wie durch Einlagerung von Albumose, müsste man auch durch Serumalbumin (ca. 0,5-proc. in Wasser) die Nucleinsäuregranula acidophil machen können, wenn diese wirklich chemisch mit den dargebotenen Eiweisskörpern sich verbinden könnten. Nach 20-stündigem Liegen in 0,5-proc. Serumalbumin waren die Nucleinsäuregranula noch vollkommen acidophob und färbten sich nur mit basischen Farben. Eine Aufnahme oder chemische Bindung des Albumines hatte nicht statt-

gefunden, desshalb sicherlich, weil das hoch colloidale Albumin eine viel zu geringere Diffusionskraft hat, nach FICK (I, p. 30) braucht 1 mg 14 Jahre, um 1 m hoch zu steigen, während Kochsalz das in 319 Tagen erreicht. Das Albumin vermag die Hindernisse nicht zu überwinden, die einer Diffusion durch die Granula entgegenstehen. Damit die Nucleinsäuregranula chemisch auf das Albumin wirken können, genügt doch vollständig die Berührung beider, die durch das Einlegen der Deckgläser in die Albuminlösung gegeben ist, ein Vordringen in die Granula wäre dagegen nicht nöthig.

Dass die Deuteroalbumose so gut aufgenommen wird, kann nicht verwundern, da sie ja viel diffusibler ist als das Serumalbumin. Ihre mechanische Bindung wird vielleicht den Anhängern der chemischen Färbungstheorie noch nicht hinreichend begründet erscheinen. Auch sie werden sich aber sicherlich durch die merkwürdigen Erscheinungen überzeugen lassen, die mit der Nachfixirung der imprägnirten Granula verbunden sind.

1. Ohne Nachfixirung; Aufhebung der Acidophobie.

Mit wenig Worten ist der sonderbare Erfolg der Albumoseimprägnation geschildert: die Nucleinsäuregranula färben sich mit den wässrigen Lösungen aller sauren Farbstoffe ebenso schnell und ebenso intensiv, wie mit den basischen, die Acidophobie ist gänzlich vernichtet. Auf anderem Wege bereits ist dasselbe gelungen durch Steigerung der Färbkraft der sauren Farben mit geeigneten Zusätzen von Schwefelsäure (Säurefuchsin, Lichtgrün, Indulin, Pikrinsäure) oder von Alaun (Eosin). Jetzt beruht der Erfolg auf einer Aenderung des Adsorptionsvermögens der Granula durch die imprägnirte Albumose.

Die Färbung mit den einfachen Lösungen der sauren Farben bedarf keiner weiteren Besprechung, wohl aber die Farbgemische, besonders die heterogenen. Während sie sonst die Nucleinsäuregranula ganz rein in dem Ton des basischen Bestandtheiles färbten, rufen sie jetzt dieselben Doppelfärbungen hervor, wie an den Granulagemischen der Chromatalbumose. In den grösseren Granulis der mit 10-proc. $PtCl_4$ gefällten Thymusnucleinsäure färbt die BIONDI'sche Mischung, die ursprünglich alles rein methylgrün färbt, jetzt auch schön tief rothe Spiegel, umgeben von einem grünen Rande (Taf., Fig 37). EHRLICH's Triacidgemisch färbt die vorherrschend grossen Granula rein roth, die wenigen kleinen mit neutrophilem Stich, nirgends ist reines Grün zu sehen. EHRLICH's eosinophile Mischung endlich, die die nicht imprägnirten Granula gar nicht färbt, lässt sie nunmehr ebenso intensiv eosinophil erscheinen, wie die Chromatalbumose.

Noch schlagender wirkt die Imprägnation in der anderen Nucleinsäurefällung ($1+10$ $PtCl_4$), die neben schönen Granulis auch Gerinnselchen enthält und, infolgedessen zu Doppelfärbungen physikalisch vollkommen vorbereitet ist. Die erste Farbe gilt für die Granula, die zweite für die Gerinnselchen (Tab. III S. 169).

An Stelle der streng basophilen Färbung ist demnach eine ausgesprochene Acidophilie der Granula, die in den 3 Versuchen roth sind, getreten, das Gerinnsel ist einmal basophil (BIONDI), dann neutrophil (Triacid) und schliesslich acidophil gefärbt. Die Eigenschaften

der Gemische, die früher ausführlich erläutert worden sind, treten deutlich hervor.

Tabelle III. Vernichtung der Acidophobie der Nucleinsäure durch Albumose-Einlagerung.

10-proc. Thymusnucleinsäure, mit (1 + 10) PtCl gefällt	BIONDI's Gemisch 3 Min.	Triacid EHRLICH's 4 Min.	EHRLICH's eosinophile Mischung 15 Min.
ursprüngliche Färbung	alles rein grün	alles rein grün	farblos
20 Stunden mit 5-proc. Deuteroalbumose imprägnirt	roth; grün	gelbroth; violett (neutrophil!!)	roth; schmutziggrau, indulinig

Die Acidophobie der Nucleinsäure kehrt zurück, wenn die Albumose wieder entfernt ist. Durch heisses Wasser wird in einer $^1/_2$ Stunde kaum etwas erreicht, in 2 Stunden aber doch schon so viel von der Albumose herausgelöst, dass Lichtgrün, Säurefuchsin, Indulin schon wieder viel schwächer färben. Um die Acidophobie vollständig wiederherzustellen, würde es noch bedeutend längerer Behandlung mit heissem Wasser bedürfen. So weit wurden die Versuche nicht getrieben, weil sie weder für noch gegen die physikalische Bindung der Albumose in den Nucleinsäuregranulis etwas beweisen können. Denn wäre die Bindung keine chemische, so könnte doch die Adsorption eine so feste sein, dass sehr langes Auswaschen erst sie gänzlich brechen könnte. Beispiele hierfür bieten die Adsorptionserscheinungen an Glas in Hülle und Fülle. Würde die Albumose dagegen bequem ausgewaschen und man wollte darin nur eine lockere Bindung durch mechanische Affinitäten erblicken, so könnte der Gegner behaupten, dass eine in Wasser leicht lösliche chemische Verbindung entstanden war, während sie im ersten Falle nur sehr schwer sich löse.

Albumoseimprägnation beseitigt aber nicht allein die Abneigung gegen die sauren Farben, sondern auch, wie schon erwähnt wurde, gegen die Eisenalaunbeizung, die der HEIDENHAIN-BENDA'schen Hämatoxylinfärbung vorausgeschickt wird. Ausführliches über das Versagen dieser sonst so aufdringlichen Methode wurde schon p. 117 mitgetheilt und auch dort bereits auf die Analogie mit den sauren Anilinfarben hingewiesen.

Genau wie die bis jetzt besprochene Thymusnucleinsäure reagirt auch die Hefenucleinsäure, deren Fällungen mit Platinchlorid oder Chromsäure durch eine halbstündige Imprägnation mit kalter 1-proc. Albumoselösung zu intensiver Färbung mit sauren Farben umgestimmt werden. Jedoch stört hier etwas der Mangel einer totalen Unlösbarkeit in Wasser, wesshalb die Granulationen schon in der Albumoselösung etwas verquellen und auch einzelne deformirt werden. Hier könnte ja der Gegner eine chemische Wechselwirkung zwischen Nucleinsäure und Albumose vermuthen. Desshalb verweise ich auf die späteren Versuche, die jeden von der Unverwüstlichkeit der Thymusnucleinsäure-Granula überzeugen müssen und jede chemische Beeinflussung ausschliessen.

Histologische Objecte mit primärer, durch Fixirungsmittel besonders secundär verstärkter Acidophobie lassen sich durch Albumoseimprägnation ebenso leicht umstimmen, wie die Nucleinsäuregranula.

Bacillus Anthracis, ferner eine nicht näher bestimmbare Fäulnissbacterie, deren geringe Färbung mit sauren Farben bereits p. 97 beschrieben wurde, färben sich äusserst intensiv, sobald mit 5-proc. Albumose imprägnirt wird (1/2 Stunde heiss oder 1 Stunde kalt). Wurzelspitzen von Vicia Faba mit, durch Platinchloridfixirung deutlich acidophoben Chromosomen (p. 102), lassen sich auf dieselbe Weise kräftig mit allen sauren Farben tingiren. Ja, aus der Lösung Biondi's, die vorher die Chromosomen schön grün gefärbt hatte, nehmen diese nach der Imprägnation so viel von dem zuerst kommenden Säurefuchsin auf, dass das Methylgrün höchstens noch einen leichten Stich verleihen kann.

Ganz allgemein kann die Imprägnirung mit Albumose zur Beseitigung der Acidophobie in allen ihren Abstufungen empfohlen werden; durch geeignete Differenzirung mit Laugenalkohol und Nachfärbung mit basischen Farben kann man auch an dem imprägnirten Material die p. 113 beschriebenen Inversionsfärbungen erhalten. Nur achte man darauf, dass das Adsorptionsvermögen der verschiedenen Gewebselemente oder Zellbestandtheile nicht uniform sein wird und desshalb Unregelmässigkeiten zu erwarten sind. Wünscht man, aus besonderen Gründen, gewisse widerstrebende Theile mit sauren Farben stark zu tingiren, so versuche man es jedenfalls mit der Albumoseimprägnation. Erst wenn diese nicht befriedigt, wende man sich an das unfehlbare Mittel des Säurezusatzes (vergl. p. 104). Es würde sich sehr empfehlen, diese beiden neuen Methoden einmal vergleichend an zahlreichen thierischen und pflanzlichen Objecten zu prüfen.

2. Mit Nachfixirung; Vernichtung des Färbungsvermögens.

Schon die geringe Menge Albumose, die von der Chromatalbumose wahrscheinlich nur adsorbirt wird, genügte, um bei der Nachfixirung die chromatophilen Eigenschaften der Granula merklich zu verschieben, die grossen waren z. B. der unmittelbaren Rothfärbung aus Ehrlich's eosinophilem Gemisch nicht mehr zugänglich, nur Temperatursteigerung oder Verlängerung der Färbzeit hatte noch Erfolg. Noch überraschender wirkt die Nachfixirung imprägnirter Albumose an den Nucleinsäuregranulis.

Tabelle IV. Imprägnirung und Nachfixirung.
Färbzeit 10 Min. Zimmertemperatur.

10-proc. Thymusnucleinsäure, gefällt mit 10-proc. $PtCl_4$	Lichtgrün	Indulin (Nigrosin)	Säurefuchsin	Eosin	Pikrinsäure	Safranin	Methylgrün	Triacid	Biondi
1) Ursprüngliche Färbung	0	0	0	0	0	+	+	grün	total grün
2) 20 Stunden mit 5-proc. Deuteroalbumose imprägnirt	+	+	+	+	+	+	+	roth und neutrophil	rother Kern, grüne Schale
3) Wie 2 imprägnirt und mit 1-proc. $PtCl_4$ 20 Stunden nachfixirt; gut ausgewaschen	0 heiss blassgrün	0	0 heiss +	0 heiss +	fast 0 ganz schwach gelblich	0 heiss +	0	0	0

In der That ist das Vermögen der unmittelbaren Färbung für alle Farben ausgelöscht, sowohl für die basischen, die sonst so energisch bevorzugt erscheinen, als auch für die sauren, denen soeben erst durch die Imprägnation mit Albumose der Weg ins Innere der Granula geebnet worden war. Das neue Hinderniss ist aber leichter überwindbar als die ursprüngliche Acidophobie der Nucleinsäure, denn kurzes Erhitzen der Farblösung genügt zu intensivster Färbung (Säurefuchsin, Eosin), die bei den rohen Granulis auch damit nicht zu erzwingen ist. Auch die basischen Farben (Safranin) werden beim Erwärmen leicht und intensiv gespeichert.

Da schon das Platinchlorid allein genügen würde, um die Nucleinsäuregranula total zu verstopfen, so ist noch zu beweisen, dass wirklich die imprägnirte Albumose an der Verstopfung nicht bloss betheiligt, sondern sogar das eigentliche Verstopfungsmittel ist. Wenn nur das Platinchlorid gewirkt hätte, dann müssten nach gründlichem Auswaschen die ursprünglichen Färbungslaunen zurückkehren, d. h. saure Farben dürften auch beim Erwärmen nicht aufgenommen werden, ausserdem müssten die basischen schon bei Zimmertemperatur färben. Beides trifft nicht zu, trotzdem dass reinlich, 2 Tage lang, ausgewaschen worden war.

Die ganze Erscheinung dürfte der chemischen Theorie der Färbung nicht entsprechen. Es wurde doch in den Nucleinsäuregranulis, die aus einer Platinverbindung schon bestehen, noch eine neue Platinverbindung ausgefällt, die Platinalbumose. Auch eine Doppelverbindung beider kann den Anhängern der chemischen Theorie zugestanden werden. Die imprägnirten Granula färbten sich, nachdem die Albumose bereits an die Platinnucleinsäure angegliedert war, wie die chemische Auffassung voraussetzen muss, intensiv mit allen Farben. Durch die Nachfixirung mit Platinchlorid könnte doch chemisch weiter nichts geschehen sein, als dass zu der schon bestehenden, sich schön färbenden Verbindung: Platin-Nucleinsäure-Albumose noch etwas Platinchlorid hinzugetreten wäre. Die neue Verbindung färbt sich nun plötzlich nicht mehr unmittelbar, sondern nur noch beim Erwärmen, geht also, chemisch gesprochen, viel schwerer eine Verbindung mit den Farbstoffen ein als vorher, und alles das nur desshalb, weil einer bereits bestehenden Platinverbindung vielleicht etwas Platin noch sich angesetzt hat. Das ist doch alles sehr unwahrscheinlich und wird es besonders auch noch desshalb, weil sowohl Platinalbumose als Platinnucleinsäure jedes für sich sehr intensiv, wenigstens mit Farbbasen, sich färben. Und wollte man annehmen, dass die imprägnirte Albumose wirklich nur adsorbirt war und als reine Platinalbumose ausgefällt wurde, die nunmehr das Färbungsvermögen der ganzen Granula beherrscht und bestimmt, so widerspräche die grosse unmittelbare Färbbarkeit der Platinalbumose dem Verhalten der nachfixirten Granula, die sich bei Zimmertemperatur nicht färben.

Klar, fast selbstverständlich erscheinen dagegen alle diese Thatsachen, wenn die Färbung nur ein Adsorptionsvorgang ist, verbunden oder besser eingeleitet mit der Diffusion der Farbstoffe durch die zu färbenden Objecte hindurch. Die rohen Granula der Nucleinsäure erleichtern diese Diffusion nur den basischen und nur diese werden dabei adsorbirt. Die sauren Farbstoffe dagegen können aus Gründen,

denen hier nicht nachgegangen werden soll, nicht diffundiren oder werden doch dabei nicht adsorbirt; wohl aber dann, wenn mit Albumose imprägnirt wurde und damit deren Adsorptionsvermögen zu dem der Nucleinsäuregranula hinzukam.

Wird nunmehr die selbst adsorbirte Albumose ausgefällt, so tritt nicht etwa eine Verstopfung der intragranulären Räumchen, die wir uns zwischen den winzigen Elementen der Granula zu denken haben, ein, sie werden nicht einmal so stark verengert, dass die Farbenmolekel nicht mehr eindringen könnten. Denn diese gelangen ja noch bequem ins Innere der Granula, sobald man erwärmt. Sondern es sind nur die mechanischen Affinitäten vermindert, an Stelle der reinen Albumose wirkt jetzt die Platinalbumose, die wir uns in unmessbar dünner Schicht über die Nucleinsäuremicelle ausgebreitet zu denken haben. Die dünne Schicht genügt wohl, um die mechanischen Affinitäten der Nucleinsäure zu sättigen, entfaltet selbst aber nur so wenige neue, dass die Farbstoffe, die herandiffundiren nicht ausreichend angezogen werden, um zu färben. Man muss durch Erwärmen ihre Diffusionsenergie steigern, um sie in die imprägnirten und nachfixirten Granula hineinzutreiben. Was für die Farbstoffe gilt, gilt auch für die Albumose selbst, wenn sie in bereits irgendwie imprägnirte Granula der Nucleinsäure noch secundär eingeführt werden soll.

3. Secundäre Einlagerung von Albumose in bereits imprägnirte Granula der Nucleinsäure.

Hat man primär Glycocoll oder Platinchlorid imprägnirt und die Granula dadurch unfärbbar gemacht, so müsste, wenn die Albumose wirklich chemisch gebunden würde, auch jetzt noch Albumose aufgenommen werden, denn Platinchlorid, das ja ein gutes chemisches Fällungsmittel für die Albumose ist, könnte höchstens noch die chemischen Affinitäten gesteigert haben, und das Glycocoll könnte doch als Amidokörper nicht die Albumose voll ersetzen. Wenn, wie Tabelle V zeigt, auch nach einer solchen primären Imprägnation die Albumose bei Zimmertemperatur secundär nicht mehr aufgenommen wird, so kann die ganze Erscheinungsgruppe, um die es sich hier handelt, nur in das Gebiet der mechanischen Affinitäten fallen. Die Nichtaufnahme der Albumose folgt daraus, dass die Granula sich auch fernerhin nicht färben (Tab. V, S. 173, No. 3 und 6), was sofort geschieht, wenn heiss imprägnirt wird (No. 4 und 7).

Bei Zimmertemperatur vermag also die Albumose das von der primären Imprägnation stammende Hinderniss nicht zu überwinden, leicht beim Erhitzen. Das könnte hier in doppelter Weise noch wirken. Einmal könnte die heisse Albumoselösung gewissermaassen als Auswaschwasser für Glycocoll und Platinchlorid dienen und so sich selbst den Platz frei machen, den sie einnehmen soll. Anderseits könnte aber auch die zugeführte Wärme die Diffusionsenergie der Albumose steigern und ihr so der Weg in die Granula gebahnt werden, aus denen die primäre Einlagerung vielleicht gar nicht entfernt zu werden brauchte. Beides wird wohl hier zusammenwirken.

Tabelle V. Secundäre Einlagerung von Albumose nach primärer Imprägnation mit Glycocoll oder Platinchlorid.
Färbzeit 10 Minuten, Zimmertemperatur, Farblösungen 0,1-proc.
0 = farblos, + = intensiv gefärbt.

10-proc. Thymusnucleinsäure, gefällt mit 10-proc. $PtCl_4$	Lichtgrün	Säurefuchsin	Eosin	Pikrinsäure	Safranin	Methylgrün	Triacid
1) Ursprüngliche Färbung	0	0	0	0	+	+	rein grün
2) Primäre Imprägnation: 5-proc. Glycocoll	0	0	0	0	0	0	0
3) Primär Glycocoll, wie 2, secundär 5-proc. Albumose, 20 Stunden kalt	0	0	0	0	0	0	0
4) Wie 3, aber secundär 5-proc. Albumose, 1/2 Stunde heiss	+	+	+	+	+	+	roth u. neutrophil, nirgends grün
5) Primäre Imprägnation: 1-proc. $PtCl_4$	0	0	0	0	0	0	0
6) Primär $PtCl_4$, wie 5, secundär 5-proc. Albumose, 20 Stunden kalt	0	0	0	0	0	0	0
7) Wie 6, aber secundär 5-proc. Albumose, 1/2 Stunde heiss	+	+	+	+	+	+	roth u. neutrophil, nirgends grün

Ganz rein tritt die Rolle des Erhitzens erst dann hervor, wenn die Granula primär mit Albumose imprägnirt und dann nachfixirt worden sind, in ihnen also eine auch in heissem Wasser unlösliche Platinalbumose erzeugt worden ist. Wird auch jetzt die kalte Albumoselösung gar nicht, die heisse aber schnell aufgenommen, so kann die Zufuhr an Energie nur auf die Diffusion der Albumose durch die primär imprägnirten Granula gewirkt haben. Tabelle VI (S. 174) dürfte eine andere Erklärung, die nur mit chemischen Vorgängen operiren möchte, ganz und gar ausschliessen.

Die Imprägnation mit heisser Albumoselösung geschah hier ebenso wie in früheren Versuchen auf dem Wasserbad in Petri-Schalen bei ca. 96°. Leider reichte das auf Deckgläsern angetrocknete Material nicht mehr soweit, um alle Farben bis zur 5. Columne verfolgen zu können. Das Resultat wird aber nicht weniger sicher sein: durch primäre Imprägnirung von Albumose und Nachfixirung werden die Granula nicht bloss gegen die Farbstoffe, sondern auch gegen die Albumose verstopft. Für beide bedarf es, um diese Verstopfung zu überwinden, der Erwärmung. Einlagerungen von Farbstoff und von Albumose werden demnach von den gleichen Umständen gehemmt und gefördert und beruhen auch auf gleichen Ursachen. Da die Albumose sicherlich nicht chemisch, sondern nur physikalisch von den Granulis festgehalten, nur adsorbirt wird, so ist sicher anzunehmen, dass der ganz gleich

Tabelle VI. Secundäre Einlagerung von Abumose nach primärer Imprägnation mit Albumose und Nachfixirung.
Färbzeit 10 Minuten, Zimmertemperatur, Farblösung 0,1-proc.
0 = farblos, + = intensiv gefärbt.

10-proc. Thymusnucleinsäure, gefällt mit 10-proc. $PtCl_4$	Lichtgrün	Indulin	Säurefuchsin	Eosin	Pikrinsäure	Safranin	Methylgrün	Triacid	BIONDI's Gemisch
1) Ursprüngliche Färbung	0	0	0	0	0	+	+	grün	grün
2) Primäre Imprägnirung mit 5-proc. Deuteroalbumose, 20 Stunden kalt oder $^1/_2$ Stunde heiss	+	+	+	+	+	+	+	roth und neutrophil, nirgends grün	rother Kern mit grüner Schale
3) Wie 2, aber mit 1-proc. $PtCl_4$ 20 Stunden nachfixirt; gut ausgewaschen	0 heiss +	0	0 heiss +	0 heiss +	fast 0	0 heiss +	0	0	0
4) Secundäre Imprägnation in No. 3; 5-proc. Albumose, 20 Stunden kalt	0	0	0	0	fast 0	0	0	0	0
5) Secundäre Imprägnation in No. 3; 5-proc. Albumose, $^1/_2$ Stunde heiss	+		+			+	+	+ wie No. 2	

erscheinende Process der Färbung ebenfalls nur auf der Sättigung mechanischer Affinitäten beruht.

Neben diesem die physikalische Färbungstheorie wesentlich stützenden Einblick in den Färbungsprocess eröffnen die Imprägnirungsversuche auch noch Ausblicke auf den Werth der gefärbten Objecte. Es wird wohl der starrste Zellmorphologe zugeben, dass die Chromosomen, die Nucleolen etc. nicht hermetisch gegen die sie umspülenden Lösungen abgeschlossen sind, dass diese vielmehr die geformten Zellelemente durchtränken, imbibiren, wahrscheinlich sogar leichter in sie eindringen, als unsere Versuche das nachahmen konnten. Nicht Deuteroalbumose, wie in diesen, sondern vielerlei andere Eiweisskörper und auch andere Stoffe, wie Gerbsäure, Amidokörper, können, der eine in pflanzlichen, der andere in thierischen Zellen, schon die lebenden Chromosomen, Nucleolen und sonstigen Granulationen erfüllen und ihnen ganz andere Färbungseigenschaften aufprägen, als ihre ursprüngliche Zusammensetzung entspricht. Kurz es ist eine neue Quelle von Täuschungen blossgelegt, die jeden einseitig färbungsanalytischen Beweis über chemische Zusammengehörigkeit von Zellelementen oder von morphologischer Werthgleichheit zur Fabel machen müssen, ganz abgesehen von allem anderen.

Kapitel VII. Einwände gegen die physikalische Theorie der Färbung.

Nachdem in den vorigen Abschnitten das Material zur Begründung der physikalischen Theorie zusammengetragen worden ist, sind

noch einige Einwendungen, die von den Anhängern der chemischen Theorie erhoben werden und noch nicht erledigt werden konnten, zu besprechen. Einige der wichtigsten Beweismittel der chemischen Theorie, wie die Metachromasie (vergl. p. 144), die Doppelfärbung mit Differenzirung (p. 107—118), sind schon erschöpfend behandelt worden. Auch die Election aus Farbgemischen ist in dem Kapitel V bis auf das primäre Adsorptionsvermögen zurückverfolgt und als mechanisch erklärbar erkannt worden. Im Schlusskapitel (p. 194) wird dieses letzte Bollwerk der chemischen Theorie, das primäre Adsorptionsvermögen, vertreten durch die Acidophobie der Nucleinsäure, noch anzugreifen sein.

Die Mehrzahl der Histologen sind, mehr oder weniger ausgesprochen, Anhänger der chemischen Theorie, die von den meisten einfach als ausreichend begründet hingenommen, von einigen, wie Paul Mayer, Griesbach, Unna, Ehrlich, lebhaft vertheidigt wird.

Ich habe mir aus zahlreichen Arbeiten von Anatomen, Zoologen und Botanikern eine Blumenlese färbungstheoretischer Aussprüche zusammengesucht, die zeigt, wie unsicher und schwankend das Urtheil ist, wie oft Anläufe zu einer physikalischen Auffassung durch die verlockendere Ausbeute, die die chemische Theorie vorgaukelt, gehemmt werden. Diese Excerpte hier zu wiederholen, dürfte wohl überflüssig sein, da jeder Zellforscher gewiss an sich selbst die gleichen Erfahrungen gemacht hat.

1. Ansichten der Färbungstechniker.

Auch unter den Färbungstechnikern sind die Ansichten getheilt, eine Vorliebe für die chemische Deutung des Färbungsprocesses ist aber unverkennbar, wie aus den Darstellungen von Knecht, Rawson und Loewenthal (I, p. 15—23) bei Hummel-Knecht (I, p. 104—113), bei Niecki (I, p. 3—5) hervorgeht. Als ein Hauptbeweis für die chemische Natur der Faserfärbung wird die von Knecht (I, p. 1557) ermittelte Thatsache angeführt, dass von der Salzsäure des Fuchsines, Chrysoidines und Krystallviolettes nichts in Wolle und Seide aufgenommen wird, wenn diese so lange in den Farblösungen gekocht werden, bis aller Farbstoff in die Faser aufgenommen und die Lösung ganz farblos geworden ist. So enthielt z. B. die Lösung von 0,2 g Fuchsin ursprünglich 0,01630 g HCl, nach der Entfärbung der Lösung durch Wolle 0,01622. In einem anderen Fall mit Seide war von der ursprünglichen HCl (0,01630 g) nach der Erschöpfung der Farblösung noch 0,01616 enthalten. Da Wolle und Seide intensiv gefärbt waren, die freie Farbbase aber farblos ist, so musste also eine neue Salzbildung in den Fasern eingetreten sein, zu der die Faser selbst die Säure geliefert hatte. Der Versuch deckt sich nicht ganz mit der histologischen Färbung, die ja schon in der Kälte meistens optimal wird oder doch nur kurzes Erwärmen verlangt. Denn durch das Kochen könnte z. B. in der Wolle Lanuginsäure abgespalten werden, die nun in der That ein gefärbtes Salz mit dem Rosanilin bilden könnte. Es müsste also, wenn Knecht's Versuch einwurfsfrei sein sollte, die Färbung ohne Erhitzen vorgenommen werden. Aehnliche Erwägungen gelten für die

Versuche mit Seide. Leider liegen quantitative Versuche über kalte Färbung von Gespinnstfasern nicht vor.

Auch ein anderer, den Färbungschemikern geläufiger Beweis für die chemische Färbung, nämlich der, dass Wolle auch beim Kochen in einer ursprünglich ganz farblosen Lösung der Rosanilinbase sich schön fuchsinroth färbt (vergl KNECHT, RAWSON-LOEWENTHAL, I, p. 17), ist nicht einwurfsfrei, weil wieder durch das Erhitzen die Wolle chemisch verändert werden könnte.

Die bereits erwähnte Lanuginsäure wurde von KNECHT (II, p. 1120) und APPLEYARD aus Wolle dargestellt und hatte die Eigenschaft, „alle substantiven Farbstoffe unter Bildung intensiv gefärbter Lacke" niederzuschlagen. Aus einem solchen mit Nachtblau erzeugten Lacke konnte ein farbloser Körper wiedergewonnen werden, der nach den Autoren (II, p. 1122) ohne Zweifel mit der benutzten Lanuginsäure identisch war. KNECHT-APPLEYARD (II, p. 1124) sind der Ansicht, dass die Lanuginsäure ein einfaches Zersetzungsproduct der Wolle und nicht bereits in der Wollfaser an einen anderen Bestandtheil unlöslich gebunden ist. Hieraus folgt aber, dass die farbfällende Eigenschaft der Lanuginsäure in den Färbprocess nur dann eingreifen kann, wenn dabei aus der Wolle wirklich Lanuginsäure abgespalten wird. Das ist wieder bei kalter Färbung ausgeschlossen und deshalb ist der Versuch für eine allgemeine Grundlage der Färbungstheorie zu einseitig.

In derselben Arbeit bringen KNECHT und APPLEYARD auch noch den Beweis (II, p. 1124), dass Wolle aus grossen Ueberschüssen substantiver Farbstoffe diese im Verhältniss ihrer Moleculargewichte oder einfacher Multipla aufnimmt. Die Autoren wollen damit einen Einwand entkräften, der oft gegen die chemische Theorie der Färbung erhoben wird, nämlich den, dass man beliebig wenig oder viel Farbstoff einlagern und beliebige Farbintensitäten erzeugen könne, dass keine Verbindungen nach molecularen Verhältnissen bestehen könnten. Dieser Einwand wiegt nun freilich, wie auch KNECHT, RAWSON, LOEWENTHAL (I, p. 18) hervorheben, nicht sehr schwer, und andererseits würde der Nachweis, dass im Maximum doch nach molecularem Verhältniss die Farbstoffe gespeichert werden, keineswegs gegen die Adsorptionstheorie sprechen. Denn nach OSTWALD (II, p. 1096—98) bestehen auch bei reinen Adsorptionserscheinungen gelöster Stoffe quantitative Gesetze, die nur noch weiter zu erforschen sind.

Auch die Eigenschaft der sauren Farbstoffe, nur in saurem Bade (mit Schwefelsäure) intensiv zu färben, wird von den meisten Färbungstechnikern zu Gunsten der chemischen Theorie gedeutet. Die Wollfaser soll durch die Säure, von der weit mehr erforderlich ist, als genügen würde, um die Farbsäure aus dem Salz abzuscheiden, selbst verändert werden und basische Eigenschaften gegenüber der Farbsäure entwickeln. Die problematische Base der Faser, die der Lanuginsäure entsprechen würde, ist noch nicht hergestellt. Da bei allen diesen Versuchen die Wolle gekocht wird, so dass sie sich theilweise durch die Schwefelsäure zersetzen muss, so sind auch diese Versuche für die kalte Färbung nicht beweiskräftig. Man ver-

gleiche hierzu desshalb die Darstellung auf p. 105, wo gezeigt wurde, dass auch die abgekühlten angesäuerten Lösungen saurer Farben die total erscheinende Acidophobie der Nucleinsäure überwinden.

Das Mitgetheilte enthält die wichtigsten Thatsachen, die von den Färbungschemikern für die chemische Natur der Färbung hervorgebracht werden. Man wird erkannt haben, dass sie die Erklärung der histologischen Färbungen durch Adsorption nicht beeinträchtigen können.

Eine besondere Theorie der Färbung hat O. Witt (I) aufgestellt, der sie weder als einen chemischen Process, noch als eine Adsorptionserscheinung, sondern als eine „feste Lösung" des Farbstoffes in der Faser betrachtet und den Färbeprocess (I, p. 4) „mit dem Ausschütteln wässriger Lösungen irgend welcher Substanzen durch Aether oder andere in Wasser unlösliche Solventien" auf eine Stufe stellt. Ein Farbstoff wird nach Witt (I, p. 5) eine Faser substantiv, d. h. ohne vorherige Beizung in wässriger Lösung färben, wenn er in der Faser löslicher ist als in Wasser. Wenn diese Anschauung dem Wesen des Färbungsprocesses entspräche, dann müssten, wie Gregorovizs (I, p. 597) und auch Schmid (I, p. 62) hervorgehoben haben, dieselben quantitativen Erscheinungen sich feststellen lassen, die für das auch von Witt als Beispiel herangezogene Ausschütteln gelten. Der Theilungscoefficient, d. h. das Verhältniss der in gleichen Volumina der beiden Lösungsmittel, z. B. Seide und Wasser, enthaltenen Farbstoffmengen, müsste bei jeder Verdünnung konstant sein. Das ist aber, wie Schmid (I, p. 62) an Eosin und Seide gezeigt hat, nicht der Fall. Ebenso wird nach Gregorovizs (I, p. 597) aus verdünnten Indigcarminlösungen in Seide relativ mehr Farbstoff aufgenommen als aus concentrirteren, während gerade umgekehrt die Seide proportional der Concentration das Indigocarmin aufnehmen müsste, wenn Witt's Auffassung richtig wäre. Zu diesen vollberechtigten Einwänden gegen Witt kommen noch andere hinzu.

Witt (I, p. 3) hebt hervor, dass die gefärbte Faser die Farbe des gelösten Farbstoffes habe, nicht die des festen, z. B. bei Fuchsinfärbung schön roth sei und nicht metallglänzend grün. Das sei wohl leicht erklärlich, wenn der Farbstoff in der Faser gelöst sei, aber werde nicht erklärt, wenn eine „mechanische Juxtaposition von Farbstoff und Fasermoleculen", wie die Adsorptionstheorie es will, vorläge. Ebenso verhält es sich nach Witt (I, p. 4) mit der Fluorescenz. Auch ohne Zuhilfenahme der Witt'schen Erklärung scheint mir diese Thatsache ganz verständlich und mit der physikalischen Theorie der Färbung wohl vereinbar. Denn diese hat sich doch vorzustellen, dass in den winzigen Zwischenräumchen, die sich zwischen den Faserelementen befinden, der Farbstoff in äusserst feiner Vertheilung festgehalten wird. Um ein grobes Bild zu gebrauchen, könnte man sagen, ebenso wie bei der wässrigen Lösung eines Farbstoffes seine einzelnen Molekeln durch die Molekeln des Wassers von einander getrennt werden und dadurch die Farbe der Lösung gegeben ist, ebenso werden in der gefärbten Faser die Molekeln des Farbstoffes durch die durchsichtigen Faserelemente getrennt, und daher muss die gleiche Farbe entstehen. Diese Anschauung wird noch dadurch einleuchtender, dass selbst zu intensiver Färbung ungeheuer wenig Farbstoff aufgenommen zu werden braucht, so dass die Vertheilung des Rhodamines z. B. in der Faser

eine äusserst feine ist, viel feiner, als wenn man eine alkoholische Rhodaminlösung breit ausgestrichen auf einer Glasplatte verdunsten lässt. Wenn das fest getrocknete Rhodamin jetzt, wie Witt anführt (I, p. 4), nicht mehr fluorescirt, so folgt daraus noch nicht, dass es in der damit gefärbten und noch fluorescirenden Seidenfaser gelöst im Sinne Witt's sein müsse, sondern es folgt nur, dass die äusserst feine Vertheilung des Farbstoffes in der Faser auf der Glasplatte nicht nachzuahmen ist. Auch mag noch ein von Ostwald (II, p. 472) angeführtes Beispiel hier erwähnt werden. Wenn man Lösungen mit erstarrenden, amorphen Zusätzen, wie Gelatine oder Gummi, eintrocken lässt, so bleiben doch die Farbenerscheinungen der Lösung erhalten. So möchte ich auch diesen zweiten Beweis Witt's für seine Färbungstheorie nicht als ausreichend ansehen. Es bleiben noch zwei Gesichtspunkte übrig. Witt (I, p. 1) sagt: „Die Anhänger der sogenannten mechanischen Theorie des Färbungsprocesses nehmen an, dass die Molecule des Farbstoffes das Färbebad allmählich verlassen und sich zwischen die Molecule der Faser einlagern, ohne dass eine chemische Bindung zwischen beiden einträte. Welche Kräfte die Farbstoffmolecule zu diesem auffallenden[1]) Platzwechsel veranlassen sollen, ist meines Wissens nie erörtert worden, es dürfte auch schwer sein, irgend welche Analogie für einen solchen Vorgang in anderen Gebieten der Naturerkenntniss aufzufinden.“

Witt übersieht hierbei gänzlich, dass die Färbung mit einem Diffusionsvorgange beginnt. Wenn die trockenen Fasern in die Farblösung gebracht werden, so imbibiren sie sich doch zunächst mit dem Lösungsmittel, mit Wasser, und nun beginnt eine Hydrodiffusion des Farbstoffes gegen das in der Faser enthaltene Wasser. Die von Witt verlangte Kraft zu dem „auffallenden Platzwechsel“ ist dieselbe, die jede Hydrodiffusion bewirkt, der osmotische Druck, der in der Farblösung herrscht. Wird das Material nach der Beizung oder aus anderen Ursachen wasserdurchdrängt in die Farblösung gebracht, so beginnt natürlich die Diffusion der Farblösung gegen das reine Wasser in der Faser sofort. An die durch den osmotischen Druck eingeleitete Diffusion der Farblösung gegen die Faser schliesst sich eine Diosmose durch die Faser an, die nur dann gefärbt wird, wenn der Färbstoff diosmiren kann und dabei durch die mechanischen Affinitäten der Faser festgehalten wird. Es bestehen nun hier dieselben Verschiedenheiten, wie bei der Diosmose durch eine thierische Membran und zwar hat jede Fasersorte gegenüber den verschiedenen Gruppen von Farbstoffen ihre besonderen Eigenschaften. Gerade dieser Umstand wird ja mit Vorliebe als Beweis für die chemische Grundlage der Färbung hervorgehoben, und auch Witt (I, p. 1) erblickt hierin den „schwerwiegendsten Einwurf gegen die mechanische Färbetheorie“, jedoch mit Unrecht, denn auch die Diosmirbarkeit der verschiedenen Substanzen durch die thierische Membran ist doch bekanntlich eine ungleiche und beruht doch nur auf den verschiedenen physikalischen Eigenschaften der Stoffe. Dass gerade die sauren Farben von

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

manchen Fasern schwer oder gar nicht aufgenommen werden, ist nur ein neues Beispiel einer schon bei der Nucleinsäure festgestellten Acidophobie.

Beachtenswerth ist noch, was Witt gegen die chemische Theorie, als deren eifrigen einstigen Anhänger er sich selbst bekennt, hervorhebt (I, p. 2). Er erklärt die chemische Theorie für unhaltbar. Gegen diese und gegen Witt's Lösungstheorie wendet sich Gregorovizs (I, p. 589, 601), der die Färbung als Adsorptionserscheinung auffasst. Man wird aus dem Mitgetheilten ersehen, dass die Erfahrungen und Ansichten der Färbungstechniker keineswegs durchweg zu Gunsten der chemischen Theorie sprechen und dass man voll berechtigt ist, nach neuen Beweismitteln für die physikalische Theorie zu suchen, ohne damit mit den Anschauungen der Färbungstechniker in einen undiscutirbaren Widerspruch zu kommen.

2. Auswaschbarkeit, Intensität und Nuance der Färbung.

Nach Hüppe (I, p. 70) ist „die Auswaschbarkeit der Farben durch deren Lösungsmittel kein genügender Beweis für die physikalische Bindung der Farben, da auch bei chemischer Bindung, die in einem Gewebe gebildeten, gefärbten chemischen Verbindungen in den angewendeten Lösungsmitteln leicht löslich sein können". Ebenso äussert sich Griesbach (I, p. 363). Schon Gierke (II, p. 196, 202) hatte hervorgehoben, dass die Auswaschbarkeit nur auf eine physikalische Bindung der Farbe hinweise, da ein einfaches Lösungsmittel, wie Wasser oder Alkohol, nicht im Stande sei, eine chemische Bindung zu lösen. Ebenso äussert sich Witt (I, p. 2), der gerade in dieser Auswaschbarkeit ein Haupthinderniss für die chemische Färbungstheorie erblickt.

Wenn man mit einer sehr verdünnten, vielleicht 0,01-proc. Fuchsinlösung in 50-proc. Alkohol färbt, so bekommt man doch sehr intensive Färbung, die sich aber sehr leicht wieder durch reinen 50-proc. Alkohol ganz entfernen lässt. Da die 0,01-proc. Lösung doch keineswegs mit Fuchsin gesättigt war, so ist sie selbst doch noch ein sehr gutes Lösungsmittel für Fuchsin. Wenn also wirklich eine in 50-proc. Alkohol lösliche chemische Verbindung Fuchsin-Gewebselement bei der Färbung entstände, so dürften solche verdünnte Lösungen gar nicht färben, weil die Verbindung sofort wieder gelöst werden müsste. Es könnten überhaupt nur gesättigte Lösungen färben. Findet dagegen eine Adsorption der diosmirenden Farbstoffe statt, so ist alles vollkommen erklärlich, denn das Auswaschen ist dann nur gewissermaassen ein umgekehrter Diffusionsvorgang vom gefärbten Object in den farblosen Alkohol. Dass verdünnte Lösungen aber färben, erklärt sich daraus, dass der gelöste Farbstoff gegen das imbibirte, noch ungefärbte Object nothwendig diffundiren muss und es infolge mechanischer Bindung und Speicherung stärker färbt, als der Concentration der Lösung entspricht.

Unna (II, p. 61) meint, dass die Entfärbung nicht einfach durch Diffusion zu erklären sei, sondern dass die von ihm vorausgesetzte chemische Verbindung „nur durch eine in Thätigkeit gesetzte neue chemische Anziehung" getrennt werden könne. Da nun

aber der Alkohol zu allen Anilinfarben sicher keine chemische Affinität hat, wie auch WITT (I, p. 2) betont, so ist doch bei der Entfärbung gar keine neue chemische Anziehung thätig. UNNA's Forderung wird also nicht erfüllt.

Später (III, p. 318) hat UNNA selbst zugegeben, dass bei der Entfärbung mit Alkohol oder Anilin, die indifferente Lösungsmittel seien, und auch in einigen anderen Fällen nur physikalische Kräfte wirken. Dagegen seien die wichtigsten indirecten Entfärbungen ohne Eingreifen chemischer Kräfte nicht erklärbar. So soll z. B. bei Säuredifferenzirung (III, p. 319) zunächst eine Tripelverbindung von Gewebe + Farbsalz + Säure entstehen, die dann bei Ueberspülen mit Alkohol theils so zerlegt werde, dass die ursprüngliche Verbindung Gewebe + Farbsalz zurückbliebe, theils das ungefärbte Gewebe allein. In Wirklichkeit ist aber das Gewebe nur das indifferente Substrat, in dem sich die Wirkung der Säure oder bei GRAM's Methode die der Jodlösung auf den adsorbirten Farbstoff abspielt.

Die Differenzirungsmittel selbst wirken nur chemisch auf den Farbstoff und überwinden mehr oder weniger seine mechanische Bindung durch das Gewebe, sie lockern ihn und erleichtern so seine Herauslösung. Ueber die bei Säuredifferenzirung entstehenden Verbindungen ist schon früher (p. 108) gesprochen worden.

Wie sich übrigens GRIESBACH, UNNA und ihre Anhänger die Löslichkeit der Verbindung Farbstoff-Gewebe vorstellen, ist nicht recht klar. Eine lösliche Verbindung im chemischen Sinne kann doch nicht gemeint sein, denn dann müsste doch diese neue Verbindung mit ihren beiden Antheilen, Farbstoff und Gewebssubstanz, in den Differenzirungsmitteln löslich sein. Es müssten also die gefärbten Elemente in toto sich herauslösen, was doch nicht geschieht. Man könnte sicherlich ein und dasselbe Präparat 100 mal hinter einander färben und entfärben, ohne auch nur eine Spur von Lösungserscheinungen an den Gewebselementen zu beobachten.

Soll die „Löslichkeit" aber nur andeuten, dass die Verbindung leicht zerlegbar ist, so könnten, wie schon erwähnt (p. 179), verdünnte Farblösungen gar nicht färben, denn ein und dieselbe chemische Verbindung kann doch in demselben Stoff (Wasser, verdünnter Alkohol) nicht zugleich löslich und unlöslich sein.

So bleibt nur die bereits von WITT und GIERKE festgestellte Ansicht übrig, dass die Auswaschbarkeit der Färbung mit einer chemischen Theorie unvereinbar ist.

Die ungleiche Intensität der Färbung, die ein und dasselbe Gewebselement in verschieden concentrirten Lösungen desselben Farbstoffes bei gleicher Färbzeit und gleicher Temperatur annimmt, soll nach UNNA (II, p. 36), GRIESBACH (I, p. 363) kein Beweis für die mechanische Theorie der Färbung sein. Nur greift UNNA, um auch hier die chemische Erklärung zu retten, zu der kühnen Voraussetzung (II, p. 37), dass die chemische Vereinigung von Farbstoff und Gewebselement „von der absoluten Herrschaft des chemischen Aequivalents jedoch in weiten Grenzen frei ist." Da bereits HÜPPE (I, p. 77) diese Verirrung UNNA's abgewiesen hat, so soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden.

Jedoch mag folgende Ueberlegung noch hinzugefügt werden. Bei allen histologischen Färbungen, selbst mit sehr verdünnten Lösungen, wird der Farbstoff relativ stets im Ueberschuss der Gewebselemente dargeboten. Selbst wenn man annehmen wollte, dass die vermuthete chemische Verbindung auf einen Theil der Gewebssubstanz 1000 Theile des Farbstoffes enthalte, was ja ganz unwahrscheinlich ist, so würde z. B. für ein Deckglas mit 100000 festgetrockneten Bacterien, die zusammen nur ca. $\frac{1}{300000}$ mg wiegen, in 1 ccm einer 0.001-proc. Fuchsinlösung noch $\frac{1}{100}$ mg Farbstoff verfügbar sein, d. h. 3000 mal so viel, als das zu färbende Object wiegt, oder nach obiger Voraussetzung 3 mal so viel, als zur Sättigung der chemischen Verbindung erforderlich wäre. Trotzdem tritt keine maximale Färbung ein, sondern eine viel geringere, die Sättigung ist nicht erfolgt. Chemisch ist das wiederum ganz unerklärbar, während die physikalische Theorie damit übereinstimmt. Denn sie hat zunächst nur mit der Diffusion zu rechnen, und diese geschieht in zur Concentration proportionalen Mengen. Je stärker die Lösung, um so stärker auch die Färbung.

Dass verschiedene Theile einer Zelle sich mit demselben Farbstoff ungleich intensiv färben, wird sehr oft als der Ausdruck einer ungleichen chemischen Affinität gedeutet. Es bedarf wohl nur eines Hinweises auf die Granulagemische, in denen die grossen Granula stets intensiver gefärbt sind als die kleineren einfach desshalb, weil sie substanzreicher sind. Die lebhaftere Färbung gewisser Theile könnte aber auch auf einem stärkeren Adsorptionsvermögen im Allgemeinen beruhen und der betreffenden Farbe gegenüber gar keinen specifischen Werth haben. Endlich bliebe noch das später zu besprechende primäre Adsorptionsvermögen übrig. Das specifische und durch Fixirungsmittel secundär umgestimmte wurde bereits behandelt (p. 95 Hämoglobin, p. 100 secundäre Adsorption).

Auch die Nuance der Farbe wird von Hüppe (I, p. 71) als ein Grund gegen die mechanische Theorie genannt: das gefärbte Object habe die Farbe des gelösten, nicht die des festen Farbstoffes. Hierzu vergleiche man p. 177.

Die Metachromasie wird von Hüppe (I, p. 72) noch als ein unbestreitbarer Beweis für die chemische Färbung angeführt. Jedoch sind die Beispiele, die er nennt, durch P. Mayer's bereits auf p. 144 erwähnte Angaben auf die Unreinheit der Farbstoffe zurückgeführt worden. Ich habe dort (p. 144) auch an dem Beispiel von Methylgrün-Fuchsin gezeigt, wie gering die Verunreinigung nur zu sein braucht, um eine Schein-Metachromasie hervorzurufen. Unzweifelhafte, nicht auf unbekannten Beimengungen oder auf nachträglichen Veränderungen, „Reifen“ der Farbkörper beruhende Metachromasien, die auch Gierke (I, p. 221) noch chemisch erklären zu müssen glaubte, sind zur Zeit keine mehr bekannt, da auch die rothen Körner, die nach Hämatoxylinfärbung in Cyanophyceen und Bacterien zu sehen sind, eine andere Deutung verlangen. Die Theorie der Färbung hat also mit der Metachromasie nicht mehr zu rechnen.

3. Lebendfärbung und Nothwendigkeit der Fixirung.

Es ist eine altbekannte Thatsache, dass lebendes Protoplasma und lebende Kerne sich nicht färben und auch die sogen. vitalen Färbungen, z. B. Ehrlich's Methylenblaufärbung der Nerven, sind doch nur insofern

eine Lebendfärbung, als der Farbstoff dem lebenden Thier injicirt wird. Denn es liegt bisher kein Beweis dafür vor, dass die mit Farbstoff beladenen Nerven noch functioniren könnten. Wie p. 78 gezeigt wurde, geben basische Farbstoffe mit Lösungen von Eiweisskörpern (Serumalbumin, Casein, Albumose) Niederschläge, die aber nicht als chemische, sondern nur als physikalische Fällungen der Eiweisskörper durch den Farbstoff aufzufassen sind. Da eine solche Fällung auch die Ursache der Ehrlich'schen vitalen Nervenfärbung sein könnte, so kann diese nicht, wie Hüppe (I, p. 76) meint, als sicherer Beweis für die chemische Natur der histologischen Färbungen ins Feld geführt werden. J a s e l b s t w e n n d i e s e u n d a n d e r e L e b e n d f ä r b u n g e n w i r k l i c h c h e m i s c h e R e a c t i o n e n w ä r e n, s o s i n d d i e B e d i n g u n g e n d e r v i t a l e n u n d d e r h i s t o l o g i s c h e n P r ä p a r a t f ä r b u n g s o g ä n z l i c h v e r s c h i e d e n e, d a s s d i e e i n e g a r n i c h t s f ü r d i e a n d e r e b e w e i s e n k a n n. Wenn es auch einstweilen nicht möglich ist, das näher zu bestimmen, was das „Leben" des Protoplasmas auszeichnet, so ist doch ein Unterschied gegenüber dem fixirten Material sicher feststellbar. Das letztere ist durchweg fest, die in der lebenden Zelle flüssigen und halbflüssigen Substanzen sind in unlöslichen Körnern, Fäden, Gerinnseln u. dergl. ausgeschieden. Es verändern, wie auch Gierke (II, p. 213) bereits hervorgehoben hat, die Fixirungsmittel durchweg den Aggregatszustand (vergl. p. 67) und schaffen damit ganz andere physikalische Bedingungen für die Aufnahme der Farben als bei der Lebendfärbung. Dazu kommt noch, was ausser von Gierke auch von den meisten anderen Forschern, z. B. Heine (I), Zacharias (VI, p. 271, 279), G. Niessing (I, p. 164), Hüppe (I, p. 81) anerkannt und lebhaft betont wird, dass die verschiedenen Fixirungsmittel mit dem Gewebsstoff neue chemische Verbindungen bilden, die ausser neuen chemischen auch andere physikalische Eigenschaften haben müssen. Zu der im Object gegebenen primären Adsorption tritt vielfach noch eine secundäre (p. 100) hinzu. Neben der Verfestigung der Protoplasmatheilchen strebt die Fixirung aber besonders danach, alles unlöslich in Wasser, Alkohol, schwachen Säuren und Farblösungen zu machen (p. 67). Erst jetzt sind die Theilchen mit jenen mechanischen Affinitäten ausgestattet, die zur Färbung unentbehrlich sind. Ohne Fixirung keine Färbung histologischer Präparate.

A l l e u n l ö s l i c h f i x i r t e n Z e l l b e s t a n d t h e i l e s i n d a b e r a l s c h e m i s c h i n a c t i v u n d i n d i f f e r e n t z u b e t r a c h t e n. Sie k ö n n t e n m i t d e m F a r b s t o f f n u r d a n n c h e m i s c h r e a g i r e n, w e n n d i e F a r b s t o f f e s e l b s t l ö s e n d w i r k t e n. Wäre aber das der Fall, dann müssten die fixirten Plasmatheilchen allmählich von den Farben gelöst werden und könnten nicht vollkommen intact bleiben. So folgt auch aus der Nothwendigkeit der Fixirung und der hierdurch erzielten vollkommenen Unlöslichkeit der Präparate in den Farblösungen, dass die Färbung nicht durch chemische, sondern nur durch mechanische Affinitäten bedingt ist.

Ebenso unlöslich wie durch die chemische Fixirung werden die Bacterien und Blutpräparate durch die physikalischen Mittel der Austrocknung und Erhitzung.

Man findet oft erwähnt, d a s s g e w i s s e F i x i r u n g s m i t t e l f ü r m a n c h e F a r b s t o f f e a l s B e i z e w i r k e n, womit doch gesagt sein soll, dass Beize und Farbstoff, wie bei den technischen Färbungen,

sich chemisch verbinden. Die Färbungen nicht ausgewaschener Fällungen (p. 84), die Imprägnirung von Fixirungsmitteln (p. 160) und die Versuche über die secundäre Adsorption geben uns die Mittel an die Hand, diese anscheinende Beizwirkung zu verstehen. Indifferente Fixirungsmittel (Alkohol, Essigsäure, Formaldehyd, Sublimat) können nicht „beizen", weil sie die primäre Adsorption nicht umstimmen. Nur diejenigen Stoffe, welche starke secundäre Adsorptionseigenschaften hinterlassen, wie die Platinmetalle, sind geeignet, beizenähnlich zu wirken, aber auch nur durch die secundäre Adsorption, nicht chemisch, wie die Beizen der Technik und wie das Eisenalaun bei der Eisenhämatoxylinfärbung.

4. Reactionsfähigkeit der gespeicherten Farben.

„Sehr entschieden spricht es für chemische Bindungen, dass Agentien, welche einen Farbstoff ausserhalb in bestimmter Weise afficiren oder modificiren, dies nach Fixirung auf der Faser oder im Gewebe nicht mehr oder in anderer Weise thun" (Hüppe, I, p. 73). Dieses Argument gegen die physikalische Theorie der Färbung stammt von Unna und Griesbach und ist von Hüppe ohne nähere Prüfung der von den Genannten mitgetheilten Versuche aufgenommen worden. Freilich mit Unrecht, denn die Versuche selbst sind keineswegs beweisend.

Unna (I, p. 39) geht davon aus, dass man Toluylenblau durch Vermischen gleicher Theile von Metatoluylendiamin und salzsaurem Nitrosodimethylanilin erzeugen kann und dass in dieser Mischung Schnitte schön blau sich färben. In 1-proc. Metatoluylendiamin werden die Schnitte graubräunlich, im Nitrosodimethylanilin grüngelblich. Brachte nun Unna solche Schnitte in die Lösung der anderen Componente des Toluylenblau, so färbten sie sich nicht blau, sondern eine Farbe verdrängte nur die andere. Hier war also, so folgert Unna, eine chemische Verbindung zwischen dem Schnitt und der Componente eingetreten, die so fest war, dass die Blaubildung mit der anderen Componente verhindert war. So fest konnte aber doch wieder die Bindung nicht sein, denn eine Componente verdrängt ja die andere. Hier ist doch wohl einfach die eine Componente durch die andere ausgewaschen worden und auch nicht bedacht, dass **gleiche** Mengen beider Componenten nöthig sind, was doch im Experiment keineswegs erfüllt war.

Ein ähnlich zu beurtheilender Versuch Unna's (I, p. 43, 44) ist folgender: Ein durch Reduction von Indophenolviolett erzeugtes Leucoproduct wird im Reagenzglas durch einen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd oder Chromsäure oder Kaliumbichromat momentan wieder violett. Mit dem Leucoproduct graubräunlich oder graubläulich gefärbte Schnitte werden nun aber durch die genannten Oxydationsmittel nicht violett, sondern theilweise oder ganz entfärbt. Der Misserfolg liegt auch hier in dem Ueberschuss der Oxydationsmittel, der schliesslich zu Extraction des Farbstoffes führte. Da auf diesen Umstand, der, wie sich bald zeigen wird, sehr wichtig ist, in Unna's Versuchen gar nicht geachtet ist, so fehlt ihnen jede Beweiskraft. Auch Griesbach hat denselben Punkt nicht berücksichtigt (I, p. 368). Eine wässrige Lösung von Azoblau wird im Reagenzglas durch concentrirte Salpetersäure sofort entfärbt, durch Ammoniak hellroth, durch concentrirte Salzsäure theilweise flockig

und körnig gefällt. Mit Azoblau gefärbte Schnitte entfärbten sich in Salpetersäure vollkommen, in Ammoniak auch, in Salzsäure blieben sie unverändert. GRIESBACH erblickt hierin einen Beweis dafür, dass chemische Bindung von Gewebe und Farbstoff bestehe, denn sonst dürfte Ammoniak nicht entfärben, sondern müsste roth färben. Hätte GRIESBACH das eben noch feuchte Präparat eine kurze Zeit über eine Ammoniakflasche gehalten und nur die Dämpfe wirken lassen, so hätte er zweifellos die rothe Farbe bekommen. Da diese Vorsichtsmassregel nicht erwähnt wird, so wurde jedenfalls Ammoniakflüssigkeit im Ueberschuss angewendet und dadurch, wie leicht verständlich, der ganze Farbstoff extrahirt. Dass die Salzsäure nicht entfärbte, ist ja verständlich, weil sie den Farbstoff theilweise ausfällt. Auch ein anderer Versuch GRIESBACH's (I, p. 370) entbehrt der kritischen Beurtheilung seitens des Autors. Wässrige Lösung von salzsaurem Rosanilin wird durch Ammoniak im Ueberschuss ganz entfärbt, bleibt aber klar. In solcher farblosen Lösung werden Schnitte beim Erwärmen mehr oder weniger, schneller oder langsamer roth. Auch in der kalten entfärbten Lösung färben sich die Schnitte nach einiger Zeit, ja, und nun kommt der Witz: die farblose Lösung nimmt selbst nach und nach eine schwachrothe Färbung an. Alles doch nur desshalb, weil das Ammoniak allmählich verdunstet und das salzsaure Farbsalz sich wieder regenerirt, was natürlich durch Erwärmen sehr beschleunigt wird. GRIESBACH allerdings schliesst daraus, dass die Gewebsschnitte, als Säure wirkend, das Salz regeneriren und so eine chemische Verbindung die Färbung veranlasst. Ja, er baut sogar (I, p. 372, 373) mehrere Apparate zusammen, um zu zeigen, dass nicht die Kohlensäure der Luft, sondern die Verdampfung des Ammoniaks die Röthung der entfärbten Lösung veranlasst. Mit solchen Experimenten wird man die chemische Theorie der Färbung niemals beweisen können.

Da nun einmal die Frage nach der Reactionsfähigkeit der gespeicherten Farbstoffe aufgeworfen war, so habe ich an gefärbten Granula- und Gerinnselfällungen und an Bakterien noch einige Versuchsreihen angestellt, die allerdings zu ganz anderen Resultaten führten und zeigen, dass Säuren und Basen die gespeicherten Farbstoffe gerade so verändern, wie im Reagenzrohr. Die Wirkung der Säure (concentrirte Salzsäure) wurde durch allmähliches Neutralisiren mit Ammoniak bis zur völligen Regenerirung der ursprünglichen Farbe abgestumpft und ebenso umgekehrt. Die an Deckgläsern angetrockneten gefärbten Objecte dürfen nicht mit der flüssigen Säure und Base behandelt werden, auch nicht mit verdünnten, weil dann zu leicht der ganze Farbstoff ausgezogen wird, ohne dass die Wirkung der Säure oder Base zum Vorschein kommt. Man tupfe nach der Färbung das Spülwasser gut von den Präparaten ab, so dass sie eben noch feucht sind, und halte sie nun über die Flasche mit Ammoniak oder Salzsäure, so dass bloss die Dämpfe wirken. Man wird die allmähliche Farbenänderung ganz im Sinne der Reagenzrohrversuche gut beobachten können. Sind nach der ersten Reaction, z. B. über der HCl, die Präparate zu trocken geworden, so befeuchte man sie nicht mit flüssigem Wasser und halte sie damit über die Ammoniakflasche, denn jetzt würde sich zu viel

Ammoniakdampf lösen und die Farbe zu schnell auswaschen. Man hauche die trockenen Präparate einige Male an, jetzt haben sie genügende Feuchtigkeit, um die zweite Reaction, die Regeneration der Farbe, durch Neutralisation ausführen zu können. Das Ammoniak kann man auch statt mit Salzsäuredämpfen zu neutralisiren, durch leichtes Erwärmen austreiben und so die Farbe, wenn sie verändert war, regeneriren.

Lösungen von Säurefuchsin, dem rothen sauren Salze der Rosanilinsulfonsäure, werden durch Basen entfärbt, weil die so entstehenden neutralen Salze farblos sind. Durch Salzsäure, überhaupt stärkere Säure werden die gefärbten sauren Salze wieder regenerirt. Mit Säurefuchsin intensiv roth gefärbte Albumosegranula (Fällung mit Kaliumbichromat oder mit Platinchlorid) entfärben sich in Ammoniakdämpfen in ganz kurzer Zeit, in weniger als 1 Minute; über Salzsäure tritt in derselben Zeit ungefähr die rothe Farbe ungeschwächt wieder hervor. Erwärmt man die entfärbten Präparate leicht und treibt so allmählich den Ammoniak aus, so erscheint wieder das ursprüngliche Roth. Man kann diese Versuche mit demselben Präparat mehrmals wiederholen, ohne dass die Färbung abnimmt.

Eine Lösung von Gentianaviolett wird im Reagenzrohr durch allmählichen Zusatz von Salzsäure zunächst moosgrün und endlich gelbbraun unter Bildung der nur in saurer Lösung beständigen zwei- und dreisäurigen Salze. Ammoniak ruft die violette Farbe wieder hervor.

Die oben genannten Präparate der Albumosegranula, intensiv mit Gentiana gefärbt, werden über HCl durch Moosgrün schliesslich ganz gelbbraun, über Ammoniak wieder durch moosgrün tief violett, bei längerer Wirkung schliesslich farblos. Ebenso entfärbt stärkerer Ammoniakzusatz auch im Reagenzrohr die Gentianalösung, weil nunmehr die freie, farblose Farbbase abgeschieden ist. Durch Neutralisiren mit HCl lässt sich natürlich das farbige Salz wieder regeneriren. Auch die Granulapräparate entfärben sich über Ammoniak und werden über Salzsäure wieder violett, bei längerer Einwirkung, wie schon erwähnt, schliesslich gelbbraun. Auch diese Umfärbungen lassen sich mit demselben Präparat beliebig oft wiederholen. Weitere Beispiele bringt folgende Tabelle (S. 186), in der, da alle Objecte sich vollkommen gleich verhielten, sogleich alles vereinigt ist.

Wenn im Reagenzrohr zugleich mit der Farbenänderung eine leichte Fällung eintritt, wie bei NH_3 No. 7 und 9, so entfärben sich die Objecte nicht gänzlich, aber doch nahezu, was leicht daraus sich erklärt, dass der ausgefällte Farbstoff nicht oder schwerer entfärbt wird. Wo nichts angegeben ist, bleiben die umgefärbten Lösungen ganz klar.

Um die Thymusnucleinsäure-Granula intensiv mit sauren Farben zu färben, werden sie nach p. 168 vorher mit 5-proc. Albumose imprägnirt. Schon mit blossem Auge ist in allen Fällen die Farbenänderung wahrzunehmen, bei Nucleinsäure und den Granulis aus Albumosechromat wurde zur Controle auch noch mikroskopisch festgestellt, dass wirklich die Granula selbst und zwar alle in gleicher Weise sich so umgefärbt hatten, wie es dem blossen Auge erschien.

Einwirkung von Salzsäure und Ammoniak auf gefärbte Objecte.
(Reactionsfähigkeit der gespeicherten Farbstoffe.)

Farbstoff	Versuche im Reagenzrohr				Objecte: 1) Albumosegranula ($HgCl_2$, $PtCl_4$ Kaliumbichromat, Formaldehyd), 2) Serumalbumin, 3) Caseingerinnsel ($PtCl_4$), 4) Thymusnucleinsäure ($PtCl_4$).				
	1) HCl	2) NH_3	1) NH_3	2) HCl	1) HCl	2) NH_3	1) NH_3	2a) HCl	2b) Erwärmt
1) Lichtgrün	braun	grün	entfärbt	grün	braun	grün	entfärbt	grün	grün
2) Säurefuchsin	0	—	entfärbt	roth	0	—	entfärbt	roth	roth
3) Indulin	0	—	röthlicher Stich, sonst unverändert	stahlblau	0	—	unveränd. oder röthlich. Stich	stahlblau	stahlblau
4) Pikrinsäure	entfärbt	gelb	0	—	entfärbt	gelb	0	—	—
5) Eosin	gelbe Fällung	roth, klar	0	—	orange	rein eosin	0	—	—
6) Safranin	dunkelblau	roth	0	—	dunkelblau	roth	0	—	—
7) Fuchsin	braun	roth	entfärbt, leichte Fällung	roth	gelblichbraun bis braun	roth	fast farblos	roth	roth
8) Methylgrün	gelbbraun	blaugrün	entfärbt	blaugrün	gelbbraun	blaugrün	entfärbt	blaugrün	blaugrün
9) Gentianaviolett	moosgrün, gelbbraun	violett	entfärbt leichte Fällung	violett	moosgrün bis gelbbraun	violett	fast farblos	violett	violett
10) Methylenblau	grün	blau	0	—	blaugrün bis grün	blau	0	—	—
11) Hämalaun (Mayer)	roth	blauviolett	dicke schwarzblaue Fällung	zur ursprüngl. Farbe sich lösend	roth	blauviolett	reiner blau	blauviolett	blauviolett

Zur Ergänzung der Tabelle sei noch erwähnt, dass eine ebenso vollständige Versuchsreihe mit *Bacillus fluorescens liquefaciens* und mit *gut gereinigter Schafwolle*, die 40 Stunden lang intensiv gefärbt worden war, angestellt wurde. Der Erfolg war ausnahmslos der gleiche, wie in der Tabelle. Einige Versuche mit *Jutefasern* bestätigten die mit der Schafwolle, woraus also zweifellos hervorgeht, dass *die Farbstoffe in den Fasern ebenso gebunden sind, wie in den künstlichen Fällungen und in den Bacterien, denen alle anderen natürlichen Objecte sich anschliessen.*

Besondere Beachtung verdienen noch die Versuche mit den *Albumosegranulis*, *von denen 4 Sorten, hergestellt mit Sublimat, Platinchlorid, Kaliumbichromat* und *Formaldehyd*, geprüft wurden. Hier lagen also 4 *verschiedene chemische Verbindungen der Albumose* vor, in allen 4 verhielten sich die *eingelagerten Farbstoffe ganz gleich, kein einziges Beispiel dafür, dass das Fixirungsmittel chemisch den Farbstoff beeinflusst hätte*, war zu erkennen.

Alles dies ist für die Färbungstheorie von der grössten Bedeutung. Ihre physikalische Begründung wird wesentlich gestützt durch das Verhalten des Eosins (Tab. No. 5). Durch Säure wird aus der Eosinlösung die in Wasser unlösliche freie Farbsäure, das schön orangegelbe Tetrabromfluorescin ausgefällt. Auch die Granula, besonders schön die Caseingerinnsel, verlieren über HCl die reine Eosinfarbe und werden orangegelb, genau der Farbe des ausgefällten Tetrabromfluorescines entsprechend. Nimmt man an, dass das Eosin nur adsorbirt ist, so hat der Farbenwechsel nichts Unerklärliches, es wird einfach aus dem in den feinsten Zwischenräumchen der Granula liegenden Eosin die Farbsäure ausgefällt. Wie soll sich aber die chemische Theorie der Färbung damit abfinden? Sie nimmt doch an, dass eine chemische Verbindung zwischen Farbe und Object entsteht, dass also beim Eosin das Tetrabromfluorescin sich mit einem basischen Bestandtheil des Objectes zu einem neuen Farbsalz vereinigt und hierauf die Färbung beruht. Wenn nun durch HCl diese Verbindung zerstört wird, die Salzsäure an die Stelle der Farbsäure tritt, so müsste die Färbung verschwinden, denn es besteht doch jetzt keine chemische Verbindung mehr zwischen Farbsäure und Object. Die erstere ist aus dem Molekel hinausgeworfen. Da aber die Objecte gefärbt bleiben, und nur den Farbenton der freien Säure annehmen, so fragt es sich, wo steckt jetzt das färbende Princip. Im Molekel des Objectes kann es nicht sein, es muss also ausserhalb der Molekel, in den Elementarzwischenräumchen adsorbirt stecken. Trotzdem färbt es ungeschwächt, weil eben jede Färbung von Fasern und histologischen Objecten nur durch Adsorption veranlasst wird.

Nachdem gezeigt worden ist, dass der von Unna und Griesbach verlangte Nachweis (p. 183) wirklich bequem und ganz allgemein sich erbringen lässt, ist noch zu überlegen, ob hieraus wirklich so viel gegen die chemische Theorie folgt, wie die Genannten voraussetzen. Verdünnte Schwefelsäure gibt mit Chlorbaryum stets den bekannten unlöslichen Niederschlag von Baryumsulfat, derselbe Niederschlag entsteht aber mit Chlorbaryum auch in jeder Lösung eines beliebigen schwefelsauren Salzes, in dem doch die Säure chemisch gebunden ist. Trotzdem reagirt sie hier genau so wie im freien Zustande. Oder wenn man Albumoselösung mit Tannin fällt, so stellt doch der mit destillirtem Wasser reichlich ausgewaschene Niederschlag eine chemische Verbindung, Albumosetannat, vor, und trotzdem ist die Gerbsäure noch durch die bekannten Reagentien nachzuweisen. Imprägnire ich aber (p. 163) Platinalbumose mit Tannin, das so nur mechanisch gebunden wird, so ist sein Nachweis ebenfalls möglich.

Ein ähnliches Beispiel gibt die Einlagerung von Berliner Blau (vgl. Zacharias, II, p. 211) z. B. in eine Fällung von Hühnereiweiss mit Ferrocyankalium und Essigsäure, die sorgfältig ausgewaschen worden ist. Hier ist doch wiederum das Ferrocyan mit dem Eiweiss chemisch gebunden, und dennoch reagirt es mit Eisenchlorid wie im Reagenzrohr. Selbst wenn die Tannin- und Ferrocyankaliumfällungen von Eiweiss, auch nach gründlichstem Auswaschen, noch eine geringe Menge des Fällungsmittels adsorbirt enthalten sollten, so wird doch

zweifellos die Hauptreaction durch das chemisch gebundene Tannin oder Ferrocyan bewirkt.

Diese Beispiele werden genügen, um zu zeigen, dass durch eine vollständige chemische Bindung die Reactionsfähigkeit der Farbstoffe nicht verändert zu sein braucht und dass das ganze von Unna und Griesbach ausgeklügelte Argument weder für noch gegen die chemische Färbungstheorie sprechen kann. Immerhin wird es die Genannten und ihre Anhänger beruhigen, zu sehen, dass die eingelagerten Farbstoffe wie im Reagenzrohr reagiren.

Kapitel VIII. Chromatin und Kernfarbstoffe.

Als im Jahre 1880 Flemming (X, p. 158) den Namen Chromatin einführte, wollte er damit nur diejenige Substanz im Zellkern bezeichnen, „welche bei den als Kerntinctionen bekannten Behandlungen mit Farbstoffen die Farbe aufnimmt". Das Chromatin sollte durch den ganzen ruhenden Kern vertheilt sein, zwar vorwiegend in den Nucleolen, dem Netzwerk und der Membran, aber auch in der Zwischensubstanz; bei der Kerntheilung sollte es lediglich in den „Fadenfiguren", den Mitosen, sitzen. In seinem bekannten Zellenbuch (I, p. 129, 130) hebt Flemming besonders hervor, dass es noch zweifelhaft sei, ob das Chromatin die ganze Masse des Kernnetzes aufbaue oder nur als Hauptbestandtheil in ihm und den Nucleolen, neben einem Rest, der nicht Chromatin sei, vorkomme. Das Chromatin ist für Flemming mehr ein chemischer als ein morphologischer Begriff. Als reine Kerntinctionen führt Flemming (I, p. 383) an: 1) das Hermann'sche Verfahren, aus dem sich die heute allgemein bekannte Safranin-Gentiana-Orangemethode entwickelt hat, also eine Differenzirungsfärbung mit basischen Farben; 2) Methylgrün-Essigsäure, besonders für lebende Objecte; 3) essigsaures Carmin. Einige andere ohne neues Princip habe ich weggelassen. Das Hämatoxylin wirkt nach Flemming (I, p. 382) unter Umständen nicht als reines Kernfärbemittel. Die heute herrschende Durchschnittsansicht ist wohl die, dass Hämatoxylin- und Carminlösungen, besonders aber die basischen Anilinfarben specifische Kernfarbstoffe sind. Hält man sich an die letzteren, so würde Flemming's alte Definition zu lauten haben: das Chromatin ist diejenige Substanz des ruhenden Zellkernes oder der Mitosen, die sich mit basischen Anilinfarben schnell und so dauerhaft färbt, dass beim Auswaschen der Farbstoff hier am längsten festgehalten wird. Man könnte ergänzen, dass das Chromatin saure Anilinfarben (Plasmafarbstoffe) schwerer aufnimmt und sie verschmäht, wenn ihm in einem Gemisch gleichzeitig ein basischer Kernfarbstoff geboten wird. Durch diesen Zusatz erhält aber der Begriff des Chromatines eine weitere Einschränkung, denn es hat sich gezeigt, dass die Nucleolen der ruhenden Kerne aus heterogenen Gemischen den sauren Farbstoff aufnehmen. Die Nucleolensubstanz würde also nicht zum Chromatin der neueren Zellenlehre gehören, aber nicht bloss wegen ihrer „Vorliebe" für die sauren Farbstoffe, sondern noch aus einem anderen Grunde. In homogenen Gemischen zweier basischer Farben, einer rothen und einer blauen oder grünen, z. B. Methylgrün-Fuchsin, färben sich die Nucleolen roth, das Gerüstwerk des ruhenden Kernes und die Chromosomen blau, freilich, wie nicht oft genug betont werden kann, daneben auch stets in Mischfarben aller Nuancen. Die Hauptmasse der Nucleolen aber,

daran ist nicht zu mäkeln, färbt sich roth. Die Cyanophilie im blaurothen Gemisch wird zum Characteristicum des Chromatines und besonders seines Zustandes während der Mitose, was STRASBURGER (II, p. 38) geradezu als die karyokinetische Reaction des Chromatines bezeichnen möchte. Stillschweigend ist freilich immer zu ergänzen: das blaurothe Gemisch muss aus zwei basischen Farben bestehen, von denen die blaue concentrirter ist. Denn überwiegt das Roth, so färben sich sowohl die Chromosomen als auch die Nucleolen, kurz alles so intensiv roth, dass das Blau ganz ohnmächtig wird. Warum ist bereits erörtert worden (p. 141). Es ist weiter stillschweigend zu ergänzen, dass das blaurothe Gemisch, falls es eine Farbsäure enthält, nur dann das Chromatin blau färbt, wenn der basische Farbstoff blau, der rothe sauer ist z. B. Methylenblau-Säurefuchsin. Es ist also sowohl die Acidophilie der Nucleolen, als auch die Cyanophilie des Chromatines an mehrere Bedingungen gebunden, zu denen noch die eines geeigneten Fixirungsmittels hinzutreten würde. Wollte man das Chromatin mehr als einen chemischen Begriff fassen und also die morphologische Bedingung, dass es im ruhenden oder sich theilenden Kerne vorkommen müsse, fallen lassen, so müsste man unbedingt beweisen, dass die erwähnten Farbenreactionen wirklich eine chemische Grundlage haben. Denn fehlte ihnen die Präcision eines chemischen Vorganges, dann wäre es doch nicht möglich, ohne morphologische Anhaltspunkte ein sich bestimmt färbendes Gebilde als Nucleolus oder als Chromatinbrocken zu bestimmen. Wenn z. B. ZIMMERMANN (I) kuglige Gebilde im Cytoplasma sich theilender Zellen nur desshalb als Nucleolen erklärt, weil sie sich in Methylgrün-Fuchsin roth färben, oder wenn MEVES (III, p. 134—136, 138, 158) im Plasma vorkommende Kügelchen nur desshalb für aus dem Kern ausgestossenes Chromatin hält, weil sie sich entsprechend färben, so setzen die Autoren voraus, dass die Farbenreactionen eindeutig sind, und den Werth chemisch-analytischer Reactionen haben. Es läuft also alles wiederum auf die Theorie der Färbung hinaus.

Wiederum mag an die künstlichen Granulagemische, besonders diesmal die Platinfällungen von Albumose und Thymusnucleinsäure erinnert werden. Methylgrün-Fuchsin färbte (p. 140) die grossen Granula der Platinalbumose schön blaugrün, die kleinen rein roth, ebenso auch in der Fällung der Thymusnucleinsäure. Die reine Kerntinction Safranin-Gentiana verlieh durchweg denselben grossen Granulis eine intensiv rothe, den kleinen eine violette Färbung. Man stelle sich nun einmal vor, nicht etwa, dass solche Artefacte von ungleichem Korn in den fixirten Zellen sich fänden, aber dass sog. Chromatin- oder sog. Nucleolarsubstanz in grossen und kleinen Körnern vorhanden wäre, so müssten doch genau dieselben Doppelfärbungen entstehen. Welche Täuschungen und Irrwege würden den Zellforscher erwarten, der so, wie es leider jetzt so beliebt ist, seine Schlüsse ziehen und die geheimsten Umwälzungen in der Zelle, die Wanderung des Chromatines und der Nucleolarsubstanz aus solchen Chromatophilien herauslesen wollte. Da man meinen könnte, die Albumose stehe den das Chromatin aufbauenden Stoffen zu fern, so denke man an die Versuche mit Thymusnucleinsäure. Die Erwähnung der Nucleinsäure ist vielleicht manchem eingefleischten Färber besonders willkommen, weil sie ja in der That „chromatophil“ ist, saure Farben verschmäht und als wesentlicher Bestandtheil des Kernes auch mikro- und makro-

chemisch erkannt worden ist. Nach LILIENFELD (I. p. 394) ist es sogar „höchst wahrscheinlich, dass während der Mitose die Chromatinschleifen aus freier oder sehr eiweissarmer Nucleinsäure bestehen“. Obgleich LILIENFELD selbst nur auf Färbungsversuchen fusst, sei doch dieser Satz hier wiederholt, um ihn den chemischen Versuchen MIESCHER's gegenüberzustellen. MIESCHER (III. p. 407) berechnet, dass die mit verdünnter Salzsäure extrahirten Köpfe des Lachsspermas, die aus dem Kern der Spermatiden hervorgegangen sind, 60.5 Proc. Salmonucleinsäure, 35.5 Proc. Protamin und den Rest Salze, z. B. 0.14 Proc. Gyps enthalten. Die tinctoriellen Eigenschaften des eiweissähnlichen Protamins in granulärer Fällung sind leider nicht bekannt, die Nucleinsäure wird sich wohl so verhalten, wie die Thymusnucleinsäure, also acidophob sein. Da sie vorherrscht, ist auch anzunehmen, dass sie die färberischen Eigenschaften der Spermaköpfe bestimmt, die sich nach ZACHARIAS (VII. p. 193), z. B. bei Triton, mit Methylenblau-Säurefuchsin schön blau färben. Soviel unterliegt keinem Zweifel, dass der Gehalt der Kerne an Nucleinsäure ihre färberischen Eigenschaften wesentlich beeinflusst. Aber doch nur eine, nämlich die partielle Abneigung gegen saure Farben, aus der dann in heterogenen Gemischen die Scheinbasophilie von selber sich ergibt. Die Blaufärbung in Gemischen basischer Farben kann nie und nimmermehr auf die Nucleinsäure geschoben werden.

Es würde nach dem Vorgebrachten sich der Begriff des Chromatines so umzugestalten haben: Chromatin ist die nucleinsäurehaltige färbbare Substanz des Zellkernes, die mit steigendem Gehalt an Nucleinsäure immer schlechter sich mit sauren Farben in wässriger Lösung färbt. Es würde aber verfrüht sein, das Chromatin chemisch der Nucleinsäure oder auch nur einem Nuclein gleichzusetzen, denn sicherlich ändert sich die Zusammensetzung des „Chromatines“ während des Zelllebens fortwährend. Noch ein Punkt verdient besondere Beachtung. Die Chromosomen sind doch, wie p. 69 auseinandergesetzt wurde, in der lebenden Zelle, ebenso wie sicher viele andere Bestandtheile, z. B. auch die Nucleolen, nicht feste und in ihrer Form und ihrem Bau unabänderliche Körper, etwa wie die Fällungsgranula aus Thymusnucleinsäure, sondern sie sind mehr oder wenig flüssig, mit anderen gelösten Stoffen mischbar und werden erst durch die Fixirungsmittel zu jenen unlöslichen, festen Körperchen als die sie in den Präparaten erscheinen. Schon vor oder während der Fixirung können also die Chromosomen mit Stoffen imprägnirt werden, die ihnen ein ganz neues Tinctionsvermögen aufprägen, ähnlich wie die früher (p. 166) beschriebenen Imprägnirungen. Das wird geschehen, selbst wenn ein Farben gegenüber indifferentes Fixirungsmittel, wie Sublimat, verwendet wird. Kurz, es können durch die Fixirung als Haupt- und Nebenwirkung so neue Adsorptionsverhältnisse geschaffen werden, dass das Tinctionsvermögen auch des Chromatines grossen Schwankungen unterliegen muss. Das ist oft genug schon beobachtet worden, und daher haben viele Stimmen sich gegen die Farbenreaction auf Chromatin erhoben. Man vergleiche z. B. HEIDENHAIN (II, p. 123, Anmerk. 3), der freilich seine Mahnung später selbst nicht mehr befolgt hat, ferner MIESCHER (I. p. 601), und auch ZIMMERMANN's Ausspruch (II. p. 472), dass gleichwerthige Zellbestandtheile ein verschiedenes tinctorielles Verhalten zeigen können.

Zu alledem tritt endlich hinzu, dass die Färbung überhaupt keine chemische ist, sondern nur auf mechanischer Affinität beruht, die bei gleich bleibender chemischer Zusammensetzung schon mit der Ablagerungsform sich ändert. Nur insoweit das Adsorptionsvermögen eine Folge der chemischen Zusammensetzung ist, könnte die Färbung zur Bestimmung herangezogen werden, z. B. wenn das Chromatin wirklich stets aus reiner Nucleinsäure bestände, die Acidophobie gegenüber wässrigen Lösungen saurer Farben. Das wäre aber auch alles, und dazu fehlt einstweilen jede Berechtigung.

Der Begriff des Chromatines kann also der morphologischen Merkmale nicht entbehren und ist in Wirklichkeit sogar rein morphologisch, die Färbung dient nur zur Verdeutlichung der vorhandenen Structuren, kann aber nicht zur mikrochemischen Analyse verwerthet werden. Ebensowenig auch zur Bestimmung des morphologischen Werthes eines Zellbestandtheiles.

Daher ist der grosse Missbrauch, der jetzt mit dem Worte Chromatin getrieben wird, durchaus zu verwerfen. Zu welchen Absurditäten die neuere Zellforschung sich durch die Färbung treiben lässt, mögen noch einige Beispiele zeigen. Rosen (II, p. 304) behauptet, dass eine gewisse Substanz, das Nuclein, die Kerne cyanophil mache und der männliche Kern besonders reich daran sei, der erythrophile weibliche aber gar kein Nuclein enthalte. Aehnlich äussert sich Schottländer (I, p. 300). Es fehlt also nach dieser Auffassung den weiblichen Kernen das Chromatin oder doch sicher das Nuclein (Nucleinsäure), in denen man doch jetzt mit besonderer Vorliebe den Träger der erblichen Eigenschaften wittert. Was nun? Rabl (I, p. 448, 449) hat eine neue Erscheinung, die Karyophthise, entdeckt. Solche chromatophthisische Kerne der Haut bleiben mit Safranin-Gentiana röther als ein normaler ruhender Kern. Da nun, folgert der Autor, auch die Mitosen sehr safranophil sind, so scheint das Chromatin in so entgegengesetzten Processen wie Mitose und Karyophthise die „gleiche Umwandlung" zu erfahren. Das ist genug! Unter dem Titel „farblose Kerne" beschreibt Henking (I, p. 206, 207) Kerne, deren Details schön sichtbar seien, aber sich nicht chromatinartig färben, weil eine „chemische Veränderung" des Chromatines eingetreten sei. Man erinnere sich ferner an die bereits genau geschilderte (p. 155) Controverse über das Chromatin in den Spinndrüsenkernen der Raupen. Man denke weiter an die von Flemming (XII, p. 223) zuerst erwähnte Erscheinung der Chromatolyse, die von späteren Forschern ausgiebig übertrieben worden ist. Jedes Bröckchen und Klümpchen im Cytoplasma, das kernähnlich gefärbt ist, wird als Chromatin gedeutet. Man wird schliesslich zustimmen, dass das Chromatin zur hohlen Phrase herabgesunken ist, und dass nur von einer Neubelebung dieses Begriffes ein Aufschwung aus dem Färbungstaumel zu erhoffen ist.

Es bleibt nur der Ausweg der mikrochemischen Untersuchung. Auch hierzu sind bereits Anläufe gemacht worden. Der eine von Fr. Schwarz (I) ist nach der überzeugenden Kritik von A. Zimmermann (IV, p. 28—33) wohl als verfehlt zu betrachten. Aber auch die zahlreichen Versuche von Zacharias, durch Pepsinverdauung von frischem oder in Alkohol gehärteten Material die Vertheilung der Nucleinsäure und ihre Beziehungen zum Chromatin zu ermitteln, sind noch nicht über den ersten Anfang hinausgekommen. Man vergleiche nur, was p. 146 über den verschiedenen Nucleingehalt männlicher und

weiblicher Kerne nach den Untersuchungen von ZACHARIAS berichtet wurde.

Ebenso wie das Chromatin nur ein rein morphologischer Begriff ist, ebenso ist auch der der Kernfarbstoffe von morphologischen Grundlagen nicht loszulösen. Auch ZACHARIAS (VII, p. 186) hat vor kurzem mir zugestimmt, dass es Kernfarbstoffe in dem Sinne nicht gebe, dass man schon an ihrer Aufnahme die Kernnatur eines beliebigen Zellbestandtheiles erkennen könne. Es muss stets das morphologische Bild hinzutreten. Ja früher (VIII, p. 284) sagte ZACHARIAS sogar: „Es erhellt also, dass man aus dem Eintreten der Färbung bei Anwendung der Kernfarbstoffe nicht ohne Weiteres auf das Vorhandensein von Nuclein schliessen darf, das Ausbleiben der Färbung aber die Vermuthung rechtfertigt, es sei kein oder nur sehr wenig Nuclein vorhanden.“ Damit könnte die Frage erledigt sein, wenn nicht, wie bekannt, BÜTSCHLI und die meisten Bacteriologen aus der Färbbarkeit der Bacterien mit Kernfarbstoffen sonderbare Schlüsse über die Natur der Bacterien gezogen hätten. Ich (III) habe diese Anschauungen ausführlich bekämpft und möchte hier nur noch den Beweis nachtragen, dass die Bacterien sich nicht einmal mit „Kernfarbstoffen“, also mit basischen Anilinfarben so färben, wie es BÜTSCHLI's Auffassung fordert. Wenn man Deckglastrockenpräparate des Milzbrandbacillus, deren Färbung mit einfacher Farblösung man auf p. 92 u. 97 findet, mit EHRLICH's Triacid oder mit BIONDI's Lösung behandelt, so färben sie sich nicht rein grün mit dem dargebotenen Kernfarbstoff, sondern theils roth, theils mischfarbig, theils rein grün, ein buntes Bild, aber keine reine Basophilie. In bacillenreicher Niere ($HgCl_2$ fixirt) einer Milzbrandmaus gaben die genannten Mischungen typische blaugrüne Kernfärbungen, die Bacterien dagegen hatten den „Kernfarbstoff“ verschmäht und waren roth gefärbt wie das Protoplasma. War mit EHRLICH's eosinophilem Gemisch behandelt, so hatten wohl die Zellkerne das Indulin aufgenommen, aber nicht die Bacillen, die orangeroth waren, wie das Cytoplasma.

Wurzelknöllchen der Lupine, in $HgCl_2$ fixirt, gaben mit BIONDI's Mischung und mit Triacid dasselbe Bild: Zellkerne tief grün oder blaugrün, die Bacterien rein roth, cytoplasmatisch. Dieselben Knöllchen, mit Chromosmiumessigsäure fixirt, und mit Safranin-Gentiana nach FLEMMING behandelt, hatten schön rothe Kerne und violette Bacterien. In keinem Falle also eine „Kernfärbung“ der Bacterien, was alle diejenigen, die die Kernfarbstoffe als Reagens auf Kernnatur gelten lassen möchten, wohl davon überzeugen wird, dass die Bacterien keine frei lebenden Kerne sind.

Unter den basischen Farbstoffen könnte man *mit einem Schein von Berechtigung nur das Methylgrün als Kernfarbstoff bezeichnen*, weil es in der That (vergl. p. 90) viele Eiweisskörper nicht, Nuclein und Nucleinsäure aber stark färbt. Die bekannte Verwendung des Essigsäure-Methylgrünes, um an lebendem Material die Kerne allein zu färben, beruht hierauf aber nur theilweise. Denn die Essigsäure wird zwar die Nucleinkörper des Kernes fällen und dadurch färbbar machen, während die mannigfachen Eiweisskörper des Cytoplasmas nicht so sicher gefällt werden, oft in einem labilen Zustand zwischen Fällung und Wiederlösung sich befinden und desshalb nicht genügende Adsorptionskräfte für die Färbung mit Methylgrün entfalten. Aber selbst vorausgesetzt, dass alles in färbungsfähigem

Zustande sich befände, so beruht doch die stärkere oder sogar ausschliessliche Speicherung des Methylgrünes im Kern (Chromatin) nicht auf chemischer Bindung, sondern auf dem primären Adsorptionsvermögen der Nucleinkörper für alle basischen Farben und den bereits p. 90 dargestellten besonderen Eigenschaften des Methylgrünes, die sich nach p. 93 leicht durch Borax so beseitigen lassen, dass Cytoplasma und Chromosomen unterschiedslos sich färben. Der „specifische" Kernfarbstoff hat jetzt alles Specifische verloren.

Nochmals möchte ich an die Bacterien erinnern, deren Verhalten gegenüber gereinigtem Methylgrün, das nur schwach, sicher nicht maximal aufgenommen wird, man p. 92 vergleichen wolle. Wäre die von Bütschli verfochtene Kernnatur der Bacterien irgendwie begründet, so müssten sie sich auch intensiv mit Methylgrün färben, ja aus rohem, mit Violett verunreinigten müssten sie das Methylgrün electiv herausfischen, wie das in der That die Kerne und Chromosomen mit Sublimat fixirter Pollenmutterzellen (Funckia ovata) thun. Statt dessen färben sich Deckglaspräparate der p. 93 genannten Bacterien, also des Staphylococcus aureus, des Bacillus subtilis, Bacillus Proteus, der Sarcina lutea und endlich des Milzbrandbacillus durchweg violett, entweder ganz rein in der Farbe des verunreinigenden Methylviolettes oder mit leichten Beigaben von Methylgrün. Das mit einigem Recht als Kernfarbstoff zu würdigende Methylgrün hat also die Bacterien nicht electiv, nicht kernartig gefärbt.

Kapitel IX. Die Grundlagen der Färbung.

Die an histologischen Objecten zu beobachtende Farbenelection aus Gemischen, die mit Vorliebe als unwiderlegbares Zeugniss für die chemische Natur der Färbung genannt wird, kann verschiedene Ursachen haben. Einige Fälle, zu denen auch Ehrlich's eosinophile und nigrophile Leucocytengranulationen zu gehören scheinen, sind dadurch ausgezeichnet, dass derselbe Stoff in Körnern verschiedener Grösse abgelagert wird und dass die einzelnen Farben der Gemische gemäss ihrer relativen Diffusionsgeschwindigkeit und ihrer Concentration aufgenommen werden. Die früher besprochenen Beispiele der Granulagemische aus Platin- oder Chromatalbumose wären hier anzuführen (Taf., Fig. 12—16, 21—25, 37). Die Chromatophilie beruht hier nicht auf ungleichem primären Adsorptionsvermögen, sondern nur darauf, dass die substanzreicheren grösseren Granula mit der zuerst kommenden Farbe sich sättigen, die kleineren aber von der später herandiffundirenden überfärbt werden. Solche Substrate könnte man als homogen bezeichnen. Ihnen stehen die heterogenen gegenüber, in denen Theile von ungleichem primären Adsorptionsvermögen zusammengewürfelt sind. Hierher gehören alle histologischen Objecte, sowohl die gröberen Gewebecomplexe als auch die feinere Gliederung des Zellleibes. Die Farbenelection solcher heterogener Substrate verläuft principiell nach den Adsorptionsunterschieden und nur innerhalb der Gebilde von gleichem Adsorptionsvermögen entscheidet,

wie bei den Granulagemischen, Grösse und Substanzreichthum der einzelnen.

Das primäre, bei indifferenter Fixirung ungetrübt hervortretende Adsorptionsvermögen sowohl der Eiweisskörper als der Zellelemente wurde als indifferent bezeichnet, wenn saure und basische Farben gleich gut aufgenommen werden, und bietet der chemischen Theorie der Färbung gerade in seiner Indifferenz einige Schwierigkeiten. Denn man müsste nachweisen, dass ein solcher indifferenter Eiweisskörper, wie Albumose, in dem einen Fall als Säure, im anderen als Base sich mit dem Farbstoff zu salzartigen Körpern verbinde. Die chemische Theorie der Färbung könnte sich dabei auf die physiologische Chemie berufen, die in der That z. B. den Albuminen eine solche Doppelnatur zuschreibt. Viel überzeugender scheint aber zu Gunsten der chemischen Theorie das einseitige Adsorptionsvermögen zu sprechen, das in der totalen Acidophobie der Nucleinsäure so überraschend hervortritt und in schwächerer Form auch die Basophilie der Kerne in heterogenem Farbgemisch vermittelt. Die Zellkerne sowohl, als das Nuclein unterscheiden sich aber doch wesentlich von der Nucleinsäure, denn diese ist total acidophob, jene färben sich auch gut mit sauren Farben, nur langsamer als mit den basischen.

Aus den untersuchten Eiweisskörpern und den natürlichen Objecten lässt sich eine Scala des primären Adsorptionsvermögens aufstellen, die mit dem total acidophoben Amphopepton, das auch basische Farben nicht mehr optimal aufnimmt (vergl. p. 195) beginnt und zunächst durch die ebenfalls total acidophobe, aber basische Farben gut speichernde Nucleinsäure auf das schwach acidophobe Nuclein (Zellkern) übergeht. An dieses würde sich die indifferente Albumose anschliessen, die alle sauren und basischen Farben durchschnittlich gleich gut adsorbirt. Dann setzt die partielle Abneigung gegen Methylgrün ein, noch schwach ausgebildet beim Casein (Cytoplasma), total bei Albumin, Globulin und Hämoglobin, das auch dem Safranin keine maximale Färbung gestattet. Endlich könnte man geneigt sein, an das Ende der Scala die „acidophilen“ Granulationen der Leucocyten zu stellen, aber doch ohne Recht. Denn diese Gebilde sind (vergl. p. 96) gar nicht rein acidophil oder richtiger basophob, sie färben sich auch mit basischen Farben und verweigern viel öfter, als es nach den üblichen Darstellungen scheinen könnte, auch den sauren Farben die Aufnahme. Die Theorie der Färbung hat diesen Granulationen gegenüber keineswegs einen besonders schweren Stand, denn ihr Färbungsvermögen erscheint ja nur als eine Steigerung desjenigen des Hämoglobines. Ein solches Specificum, dem aus der Reihe der Farben das Methylgrün an die Seite gestellt werden kann, vermag die allgemeine Giltigkeit der sogleich zu entwickelnden Vorstellungen nicht zu beeinträchtigen.

Die Thatsache, dass weder unter den untersuchten Eiweisskörpern im weitesten Sinne, noch unter den natürlichen Objecten irgend ein Fall totaler Basophobie aufgefunden worden ist, der der totalen Acidophobie der Nucleinsäure als anderem Extrem entspräche, kann nicht oft genug hervorgehoben werden. Auch die durch die Fixirung mit schweren Metallverbindungen ertheilte secundäre Adsorption richtet sich nur gegen die ganze Klasse der sauren

Farben, während die ganze Gruppe der basischen Farben nicht getroffen wird. Nur das Methylgrün (Eisen, Chrom), dessen Launenhaftigkeit durch Boraxzusatz spielend zu überwinden ist, macht eine einstweilen nicht erklärbare Ausnahme.

Wir würden also, ausschliesslich der Leucocytengranulation, zu folgender Scala berechtigt sein. Es bedeutet 0 keine Färbung, + schwache Färbung resp. schwache Phobie, + + optimale Färbung ohne Verlangsamung.

Primäres Adsorptionsvermögen.

	Basische Farben	Methylgrün	Saure Farben
Amphopepton	+	+	0
Nucleinsäure	+ +	+ +	0
Nuclein und Zellkerne	+ +	+ +	+
Albumose	+ +	+ +	+ +
Casein und das meiste Cytoplasma	+ +	+	+ +
Albumin, Globulin	+ +	0	+ +
Hämoglobin	+ + (Safranin nur +)	0	+ +

Feinere Differenzen, z. B. die Farbschwäche des Indulines, sind weggelassen und würden auch nicht das in der Tabelle veranschaulichte Gesammtbild wesentlich verschieben. Die unmittelbare Nachbarschaft der phosphorhaltigen Nucleinsäure und des phosphorfreien Peptones, das gewissermaassen die erstere noch übertrumpft, wird alle diejenigen überraschen und bekehren, welche die Färbungs-Eigenthümlichkeiten der Nucleinsäure und des Nucleines mit dem Phosphorgehalt erklären möchten. Der Phosphor an und für sich hat mit der Acidophobie nichts zu schaffen, das Pepton, indifferent mit Sublimat gefällt, färbt sich mit sauren Farben gar nicht. Freilich färben auch nur die basischen wenig, Fuchsin etwa unter mittelstark, während so kräftige Farben, wie Gentiana oder Methylenblau, nur blass anhauchen. Nicht anders reagiren die schönen grossen Granula der Platinfällung des Peptones, auch nach sorgfältigem Auswaschen. Die Granula sind total acidophob und sogar noch mehr als die der Nucleinsäure, sie färben sich in dem sonst nie versagenden Alaun-Eosin nur blass, weit unter mittelstark. Säurefuchsin und Lichtgrün, durch 10 Tropfen $^1/_2$ verdünnte concentrirte Schwefelsäure so weit aufgebessert, dass die Platinfällung der Nucleinsäure sich recht intensiv färben müsste, vermögen die Peptongranula nur mittelstark zu färben; das Indulin steht sogar noch weiter zurück. Dieser äusserst ausgeprägten Acidophobie steht nun aber nicht etwa eine grosse Gier nach basischen Farben, die man vielleicht der Nucleinsäure andichten könnte, gegenüber. Auch die basischen Farben sind gegenüber dem Platinpepton stark gehemmt: Fuchsin, Gentiana, Safranin, Methylgrün und Methylenblau färben alle weniger als mittelstark. Auch durch Erwärmen ist nichts zu steigern, Biondi's Gemisch, das die Nucleinsäuregranula tief grün färben würde, und Triacidlösung färben bei Zimmertemperatur fast gar nicht.

Zwei chemisch so wenig vergleichbare Stoffe, wie Pepton und Nucleinsäure, haben also ein sehr ähnliches primäres Adsorptionsvermögen. Nur ist die Abneigung gegen die Tinction, die bei der Nucleinsäure nur auf die sauren Farben sich

erstreckt, über diese hinaus auch auf die basischen ausgedehnt. Nicht die chemische Zusammensetzung, sondern eine durch sie gegebene physikalische Eigenschaft ist bei Nucleinsäure und Pepton ähnlich ausgestaltet. Beide stehen als Zersetzungsproducte complicirt gebauter Stoffe ungefähr auf einer Stufe und sind durch einige gleiche Eigenschaften ausgezeichnet. Pepton sowohl als Nucleinsäure sind in kaltem Wasser leicht löslich, das erstere noch viel mehr als die letztere, und filtriren sehr gut, unvergleichlich besser als Eiweiss oder Nuclein; sie sind viel weniger colloidal als die Körper, von denen sie abstammen, und stehen den leicht krystallisirenden Stoffen in dieser Beziehung schon viel näher. Auch stärkere Lösungen sind viel dünnflüssiger, kaum noch viscös zu nennen. Man hat das Gefühl, als ob Pepton und Nucleinsäure ihre Molekel oder Molekelgruppen (Micelle) viel dichter, krystallähnlich zusammenlagern müssten als die übrigen Eiweisskörper. Daher kommt es, dass die Granula aus Nucleinsäure und Amphopepton stark glänzen, stärker das Licht brechen als die lockerer gebauten Granula z. B. der alkoholischen Hämoglobinfällung. Besonders fällt es auf, dass die Granula aus Albumose um so mehr glänzen, je mehr sie durch das Fixirungsmittel secundär acidophob werden. Die Osmium- oder Platingranula nähern sich in ihrem Glanz deutlich den Nucleinsäuregranulis, während die indifferente Formaldehydfällung matter erscheint, ähnlich dem Chromat. Auch die gröber punktirten Gerinnsel des schwach acidophoben Nucleines glänzen viel mehr als die indifferenteren Fällungen des Albumines, Globulines, Caseines.

Nach den herkömmlichen Anschauungen müssen wir annehmen, dass die Micelle immer kleiner und molekelärmer werden, je mehr das Colloid den krystallisirenden Stoffen sich nähert und dass auch mehr solche kleine Micelle in einem gegebenen Volum Platz haben als bei den stärkeren Colloiden. Die Micelle lagern sich also dichter zusammen und vergrössern dadurch die adsorbirende innere Oberfläche der Fällungsgebilde, die sich um so intensiver färben, je dichter sie gebaut sind, und auch dementsprechend schwerer entfärben.

Werden verschieden grosse sphärokrystallinische Granula ein und derselben Substanz ausgefällt, so sind die grösseren selbstverständlich ebenfalls die substanzreicheren, weil das Volumen mit der 3. Potenz des Radius wächst. Ein kugeliges Granulum von doppelt so grossem Durchmesser als ein anderes wird also nicht bloss doppelt so viel, sondern 8mal so viel adsorbirende Micelle enthalten und sich daher nicht bloss doppelt, sondern 8mal so stark färben als das kleinere. Desshalb wird sich das grosse Granulum auch langsamer entfärben (Differenzirungsfärbungen. Taf., Fig. 11, 17—20, 26—30, 35, 36), desshalb wird das kleinere Granulum auch leichter sich durch eine zweite Farbe überfärben (simultane Doppelfärbung, Taf., Fig. 12—16, 21, 24, 25, 37). Das grössere Granulum wird auch stärker glänzen, als das kleinere. Würde ich aber aus den grossen Granulis ein kleineres von halb so grossem Durchmesser herausschneiden, so würde dieses nicht substanzreicher sein als das ursprünglich schon kleinere und sich nun genau so färben wie dieses. Ein Ausschnitt eines grossen Granulums, das z. B. in Methylgrün-Fuchsin sich rein cyanophil gefärbt hat (Taf., Fig. 21), würde in derselben Lösung rein fuchsinophil werden. Die Spiegel der grossen Granula,

die z. B. in Pikrinsäure-Säurefuchsin rein gelb werden (Taf., Fig. 12), würden als kleine Granula herausgeschnitten, fuchsinophil sich färben. Ueberall tritt die rein mechanische Ursache der Färbung klar hervor. Nirgends wohl besser als bei der Spiegelfärbung der grossen Granula, deren Aufbau aus einem und demselben chemischen Körper wohl Niemand bestreiten wird. Dennoch geben sowohl Differenzirungsfärbungen (Taf., Fig. 11, 26—30), als auch Gemischfärbungen (Taf., Fig. 12—15) tadellose Doppelfärbungen eines und desselben Granulums, die sich auch umkehren lassen (vergl. Taf., Fig. 11 und 12). Alle diese Fälle vermag die chemische Theorie der Färbung gar nicht zu erklären. Sie würde auch versagen, wenn die Granula concentrisch geschichtet wären und um einen dichteren Kern immer lockerere Schichten sich angesetzt hätten, woraus die physikalische Theorie erst recht bequem die Spiegelfärbungen erklären könnte.

Diesen Bau der Granula setzen wir nicht voraus, wir betrachten sie als durchweg gleich dicht.

Innerhalb homogener Substrate vermag die physikalische Theorie alles wohl zu deuten, sobald man das Adsorptionsvermögen, sowohl das primäre als auch das secundäre, durch schwere Metalle erzeugte, als etwas Gegebenes und jeder weiteren Zerlegung Widerstrebendes in den Vordergrund schiebt, auf ähnliche launenhafte Erscheinungen an der Thierkohle verweisend. Es würde nur noch der Annahme bedürfen, dass das Adsorptionsvermögen, obgleich wie jede Eigenschaft abhängig von der chemischen Natur des einzelnen Stoffes, rein mechanisch wirke und nicht den Gesetzen der chemischen Affinität unterworfen sei, um auch die Acidophobie der Nucleinsäure und feinere specifische Abstufungen ihres chemischen Scheines zu entkleiden. Das ist auf dem langen Wege, den wir bis hierher zurückgelegt haben, an vielen Stellen versucht worden, in der Hoffnung, die Anhänger der chemischen Theorie eher oder später zu überzeugen.

Ich möchte noch einen kleinen Sprung in das Molecularphysikalische wagen, um das primäre Adsorptionsvermögen noch von einer besonderen Seite zu beleuchten.

Das Adsorptionsvermögen, bei Gierke's (II, p. 199—205) Erklärungsversuch unter dem Namen der Oberflächenattraction eingeführt, ist moleculare Anziehungskraft, als deren Sitz wir uns die Molekelgruppen (Micelle), zu denen sich die Molekel der Eiweisskörper vereinigen, zu denken haben. Wir können daher von einer Micellarattraction reden, die für jeden der von uns untersuchten Eiweisskörper eine gewisse Grösse hat und dementsprechend auch ein bestimmtes Attractionsfeld bestreicht. Die Anziehung selbst äussert sich auf alle Stoffe, gleichviel welche chemische Zusammensetzung sie haben, sie ist rein mechanisch zu denken. Es werden also von der Nucleinsäure sowohl saure als basische Farben ebenso gut micellar angezogen, wie jedes beliebige anorganische Salz oder wie Albumose. Diese letztere zieht ebenfalls alle die genannten Stoffe an, nur mit einer anderen Stärke als die Nucleinsäure. Ebenso würde sich natürlich diese Micellarattraction je nach dem Fixirungsmittel ändern. Immer aber, und das scheint die Hauptsache, würde sie auf alle Körper sich erstrecken, niemals in eine Micellarrepulsion für gewisse Körperklassen, z. B. die sauren Farben, umschlagen können.

Diese Indifferenz der Micellarattraction, die nur quantitativ sich ändern kann und bei jedem Körper eine bestimmte Grösse hat, ist als erste Grundlage festzuhalten. Als zweite hat die Indifferenz der Micellarinterstitien hinzuzutreten. Darunter verstehe ich, dass die intermicellaren, an der Oberfläche der Färbungsobjecte ausmündenden Räumchen niemals so eng werden, dass sie den Farbtheilchen den Eintritt versperren können. Man könnte ja dazu neigen, in solchen Verengerungen ein Hinderniss der Färbung zu sehen. Nur mit Unrecht, denn die früher beschriebenen „Verstopfungsversuche“ sprechen durchaus dagegen. Wenn Granula aus Nucleinsäure schon bei Zimmertemperatur Albumose speichern und dadurch ihre Acidophobie verlieren, so müssen die intermicellaren Räume grösser sein als die Micelle oder doch sicher als die Molekel der Albumose. Dass diese aber viel grösser anzunehmen sind als die färbenden Elementartheilchen der sauren und basischen Farben bedarf keines Beweises. Dagegen könnte die Nichtaufnahme des Serumalbumines, dessen Lösung sicherlich grössere Micellgruppen enthält, wirklich darauf beruhen, dass diese zu gross für die intragranulären Räumchen sind, daneben würde aber auch die p. 168 erwähnte gringere Diffusionsgeschwindigkeit zu beachten sein.

Selbst wenn Nucleinsäuregranula durch Albumoseeinlagerung und Nachfixirung unfärbbar geworden sind, bleibt doch die „Verstopfung“ nur ein Bild, weil durch Erwärmen immer noch sowohl Farbstoff als auch Albumose hineingetrieben werden kann.

Schon die Unfärbbarkeit nicht ausgewaschener Niederschläge (p. 84), ferner die Verstopfung (p. 162) z. B. durch Glycocoll oder Tannin wurde dadurch erklärt, dass die mechanischen Affinitäten oder die Micellarattraction durch die Fixirungs- oder Imprägnirungsmittel abgesättigt werden und dass dadurch den Farben der Platz versperrt wird. Es muss noch ergänzt werden, dass geringere Molecularkräfte sicher auch von den adsorbirten Stoffen ausgeübt werden, dass diese aber zu schwach sind, um die Farben zu fesseln. Denn Platz in rein räumlichem Sinne ist noch vorhanden, wie die imprägnirten und nachfixirten Nucleinsänregranula, die sich warm noch färben und neue Albumose speichern, zeigen. Die Verstopfung beruht also nur auf der Sättigung der Micellarattraction mit Stoffen, die selbst nur schwache mechanische Affinitäten haben.

Die weitere Betrachtnng hat also vorauszusetzen, dass die Micellarinterstitien einen grösseren Durchmesser haben, als die färbenden Elementartheilchen.

Von Seiten des Färbungsobjectes würde also zunächst das primäre Adsorptionsvermögen nur als Micellarattraction in den Färbungsprocess eingreifen. Die Grösse dieser Anziehungskraft kann man näher bestimmen nach den Vorstellungen, die über die Grösse der Micelle sich eingebürgert haben. Demnach neigen die Molekel zur Bildung immer grösserer Verbände, je colloidaler ein Stoff ist. Die den krystalloiden Körpern nahestehenden Nucleinsäuren und Peptone würden demnach kleinere Micelle haben, als die stark colloidalen Albumine, Globuline, Nucleine u. s. w., und dementsprechend würden die letzteren

eine stärkere Micellarattraction ausüben als Pepton und Nucleinsäure. Dazwischen würde die Albumose stehen.

Wenn die Acidophobie der Nucleinsäure durch Albumoseeinlagerung überwunden wird, so beruht das darauf, dass ein Körper mit stärkerer Micellarattraction einverleibt wird, der auch die sauren Farben festhalten kann. Deshalb ist es auch begreiflich, dass durch Imprägnation von Nucleinsäure den Albumosegranulis Acidophobie nicht ertheilt werden kann (p. 166), denn die stärkere Micellarattraction der Albumose kann dadurch wohl etwas, aber doch nicht so stark geschwächt werden. Dass die gegen Methylgrün abholde Chromatalbumose nach der Imprägnation mit Nucleinsäure sich doch grün färbt, beruht wohl darauf, dass die Chromwirkung durch die dünne, intragranulare Auskleidung der intermicellaren Räumchen mit Nucleinsäure ausgelöscht wird und die letztere allein wirkt.

Wir kehren zunächst zu der Behauptung zurück, dass es zur Färbung mit sauren Farben grösserer Micellarkräfte bedarf, als gegenüber den basischen. Das führt uns zu einigen physikalischen Eigenschaften der Farblösungen, die für den Färbungsprocess maassgebend sind. Wenn das trockene oder feuchte Färbungsobject in die Farblösung gebracht wird, so beginnt, wie schon p. 178 erwähnt, eine Hydrodiffusion der Farbtheilchen gegen das im Object imbibirte Wasser. Dieses Diffusionsstreben findet aber an der Oberfläche des Objectes sicherlich ein mehr oder weniger grosses Hinderniss, weil viele der herantreibenden Theilchen an die impermeablen Micelle anprallen und nur an den Mündungen der intermicellaren Räumchen ein Weg sich öffnet. Sobald Farbtheilchen hierher gelangen, kommen sie in das Feld der Micellarattraction, die sie in die intermicellaren Räumchen hereinzuziehen bestrebt ist und daher in gleichem Sinne wirkt, wie der osmotische Druck. Man kann daher diesem nur insofern einen Antheil an der Färbung zuschreiben, als er die intermicellare Einlagerung des Farbstoffes begünstigt. Die durchschnittlich grössere relative Diffusionsgeschwindigkeit der basischen Farben würde also erwarten lassen, dass diese leichter färben, als die sauren.

Viel wichtiger aber ist ein anderer Faktor, die relative Löslichkeit der Farbstoffe. Da die Beziehungen zwischen Löslichkeit und Natur der Stoffe noch nicht allgemein festgestellt werden konnten (Ostwald, II, p. 1066), so können wir hier auch nur das benutzen, was der Augenschein lehrt: die sauren Farben sind allgemein löslicher in Wasser, als die basischen. Besondere Löslichkeitsbestimmungen wurden nicht ausgeführt, man hat aber bei längerem Gebrauch doch das Gefühl, als ob das Methylgrün am leichtesten von den Farbbasen (NB. den untersuchten) sich löste, dann folgt Safranin, Methylenblau, Gentiana, weit zurück steht das allbekannt schwer lösliche Fuchsin, einer der besten Färber. Die sauren Farben sind alle viel löslicher, am wenigsten die Pikrinsäure, von der ca. 0,5 Proc. in kaltem Wasser sich löst. Dagegen kann man 2-proc. Lösungen von Lichtgrün, Eosin, Säurefuchsin leicht kalt herstellen, die monatelang klar und bodensatzfrei bleiben, während 0,5-proc. Lösungen der meisten basischen Farben wohl stets absetzen. Man vergleiche auch die Fliesspapierversuche auf p. 127 und Taf., Fig. 31—34. Je weniger löslich

ein Stoff ist, um so leichter fällt er ja natürlich aus, um so geringere Kräfte sind dazu erforderlich. Da nun die Färbung gewissermaassen als intermicellare Fällung des Farbstoffes aufzufassen ist, so leuchtet ein, dass die schwerer löslichen basischen Farbstoffe schon durch schwächere Micellarkräfte gefällt werden, als die sauren. Diese würden, wenn sie an die Nucleinsäuregranula herandiffundiren, deren schwachen Anziehungskräften nicht erliegen, sie würden an der Oberfläche der Granula gewissermaassen Halt machen. Dass sie ohne zu färben durch die Granula hindurch diffundiren, ist nicht anzunehmen, denn die intermicellare Diffusion verlangt doch viel grössere Kraft als die reine Hydrodiffusion in freiem Wasser. Damit die Farbtheilchen in die Micellarinterstitien eintreten, muss die Micellarattraction die Lösungskraft, die ihr entgegenwirkt, überwinden. Das gelingt den Nucleinsäuregranulis nur gegenüber den schwerer löslichen basischen Farben, die nun, da die Micelle, dicht zusammengelagert, eine grössere innere Oberfläche bilden, auch sehr intensiv färben. Nicht weniger intensiv färben auch die sauren Farben, wenn man durch Säure oder durch Alaun ihre Löslichkeit herabdrückt auf das Niveau der basischen Farben. Nach den Erfahrungen der physikalischen Chemie (Ostwald, II, p. 1079/80), dass eine Säure die Löslichkeit ihrer Salze im Allgemeinen vermindert, ist die Wirkung der Schwefelsäure auf die sulfosauren Farbstoffe, wie Lichtgrün, Säurefuchsin, Indulin, recht wohl verständlich. Auch der Alaun wirkt zweifellos nicht dadurch, dass er das freie Tetrabromfluorescin ausfällt, sondern dass er die Löslichkeit des nicht zersetzten Eosines herabmindert.

Hierauf beruht die Steigerung der Färbkraft der sauren Farben, die nun auch den schwächeren Micellarkräften der Nucleinsäure anheimfallen, wodurch deren Acidophobie überwunden erscheint, obgleich in Wirklichkeit eine solche Acidophobie nicht bestand, sondern nur die Löslichkeit der sauren Farben zu gross war. Da das Pepton zweifellos den Krystalloiden noch näher steht, als die Nucleinsäure, so werden die Micelle noch kleiner, die von ihnen ausgehenden Kräfte noch schwächer werden und nun nicht mehr ausreichen, die Löslichkeit der basischen Farben ganz zu überwinden. Diese werden deshalb die acidophoben Peptongranula schwächer färben, als die Nucleinsäuregranula.

Die secundäre Acidophobie der Albumose nach Platin- und Osmiumfällung würde unter der obigen Voraussetzung sich so verstehen lassen, dass die Micelle hier kleiner sind und daher geringere Kräfte entfalten, als nach der Fällung mit einer anderen Metallverbindung. Die früher entwickelte Stufenleiter nach dem spec. Gewicht der Metalle fügte sich bequem diesen Anschauungen ein.

Bedenkt man, wie feine Differenzen in der Löslichkeit der einzelnen Farben schon genügen müssen, um der Oberflächenanziehung in dem einen Fall zu entgehen, im anderen zu verfallen, so wird man einerseits die Möglichkeit gern einräumen, dass die obige Betrachtung auch vielerlei besondere Färbungslaunen einzelner Farbstoffe wohl erklären könnte, man wird aber auch andererseits die Unmöglichkeit erkennen, jeden einzelnen Fall zu analysiren.

Dass unser Erklärungsversuch nicht ganz haltlos in den Lüften schwebt, mag man auch daraus erkennen, dass eine der Acidophobie der Nucleinsäure adäquate Basophobie bisher nicht aufgefunden worden ist. Auch die ganz allgemeine Tendenz der Fixirungsmittel, mit zunehmendem spec. Gewicht des schweren Metalles acidophobe Eigenschaften zu verleihen, begünstigt die obige Anschauung. Denn es ist doch sonderbar, dass eine eben solche einheitliche Abstumpfung gegen Farbbasen mit keinem der üblichen Fixirungsmittel zu erreichen ist, deren Wirkung als eine specifische sich nur gegen das Methylgrün richtet. Gerade dieser Farbstoff mit seinen Launen (Hämoglobin, Chromfällungen!!) ist die Ursache, dass unsere Betrachtung doch wieder ihre Zuflucht zu dem Adsorptionsvermögen als einem deus ex machina nehmen muss, der uns diese Abweichungen einstweilen in freundlichem Helldunkel verschwimmen lässt. Die relative Löslichkeit der Farbstoffe ist sicher nicht der einzige Factor, der von ihrer Seite wesentlich in den Färbungsprocess eingreift. Was sonst von ihnen noch hemmend oder fördernd wirkt, würde als ihr passives Adsorptionsvermögen gegenüber den verschiedenen adsorbirenden Objecten zusammenzufassen, aber vorläufig nicht weiter zerlegbar sein.

Die Objekte der Färbung, gleichviel ob künstliche Granula oder Zellen und Gewebe können ausreichende mechanische Affinitäten nur dann entwickeln, wenn sie im festen Aggregatszustand sich befinden. Auf diese Grundlage der Färbung und die hieraus sich ergebende Notwendigkeit der Fixirung wurde bereits p. 181 hingewiesen.

III. THEIL.

Der Bau des Protoplasmas.

I. Abschnitt. Die Strahlung.

Ausser den allbekannten Strahlen- und Faserbildungen, die während der Mitose erscheinen und als Polstrahlen, Spindelfasern und dergleichen eine so grosse Rolle in der neueren Zellenlehre spielen, ferner der Spermastrahlung im thierischen Ei, der Sonnenbildung während der Endospermentwicklung der Pflanzen, lassen sich noch eine Reihe anderer Erscheinungen mit dem Namen der Strahlung zusammenfassen. In saftreichen Pflanzenzellen strahlen oft von dem im Centrum des Saftraumes liegenden Zellkern dünnere oder dickere, einfache oder sich verästelnde Protoplasmafäden nach der der Zellwand angedrückten Hauptmasse des Cytoplasmas aus. Eine ebenfalls strahlige Anordnung des Inhaltes ist ferner in thierischen, noch nicht befruchteten Eiern gesehen worden, hier freilich meist wenig auffallend (FLEMMING, IX, p. 11, Taf. I, Fig. 1, Taf. II, Fig. 5) und in ihrer Schönheit keineswegs die Spermastrahlung nach der Befruchtung erreichend.

Wie bekannt, hält man neuerdings allgemein die Centrosomen und Centrosphären für die Ansatz- und Ausgangspunkte dieser Strahlungen. In anderen Fällen aber, wo solche besondere Attractionscentren noch nicht nachgewiesen werden konnten, erscheinen die Zellkerne selbst als die Centren des Strahlensystemes. Ja, es mehren sich in neuerer Zeit die Angaben darüber, dass um den zur Theilung sich anschickenden, aber doch noch von einer geschlossenen Membran umgebenen Kern das Cytoplasma sich strahlig anordnet (KORSCHELT, III, p. 28, Taf. IV, Fig. 76; OSTERHOUT, I, p. 160, Taf. I; GUIGNARD, I, p. 183 etc.). Die gleiche Erscheinung beschreibt MOTTIER (I, p. 193, Taf. V, Fig. 45, 46; II, p. 128, 132, Taf. II, Fig. 3, 7) um die Tochterkerne in Pollenmutterzellen und Embryosäcken.

Verläuft die Theilung unregelmässig, so werden etwa abgeirrte und versprengte Chromosomen oder Kernfragmente ebenfalls zu Ansatzstellen für Strahlen oder irreguläre Spindelfasern. Eine Reihe solcher Abnormitäten ist z. B. von JUEL (I, p. 215—218) beschrieben worden, eine reichere Ausbeute geben die pathologischen Mitosen (vergl. HANSEMANN, I, II, und sehr schön auch bei O. und R. HERTWIG, I).

Statt solcher verirrten Chromosomen oder überzähliger Centrosomen (vergl. Boveri, II, p. 178, Taf. V, Fig. 93) können nun aber auch solche Inhaltsbestandtheile, die nicht in den Theilungsprocess eingreifen, zu Ansatzstellen für einzelne Strahlen oder sogar Strahlensonnen werden. So enden nach Strasburger (V, p. 357) die Polstrahlen in Fucuseiern ausser an den Kanten der Plasmawaben auch im Anschluss an ein Chromatophor oder andere körnige Gebilde. Als Cytoaster beschreibt Mottier (I, p. 176) feine Strahlensystemchen, die von gewissen Körnchen des Cytoplasmas, die nicht Centrosomen sind, ausgehen. Drüner (II, Taf. VI, Fig. 30, 31) bildet deutlich ab, dass sich die Polstrahlen an die Dotterkörperchen ansetzen, die sie ja sogar nach Drüner (I, p. 298) fortschieben sollen, um Platz für die Kerntheilung zu schaffen. Schöne Verbindungsfäden zwischen Chlorophyllkörpern beschreibt Strasburger (I, p. 163, 164, Taf. X) in den Sporenmutterzellen von Anthoceros, und Swingle (I, p. 314) beobachtete, dass die Chlorophyllkörper der Sphacelarien oft durch zarte plasmatische Fäden mit einander verbunden waren. Solche Fälle liessen sich noch viele aus der Literatur zusammensuchen.

Wie der Kern für das ganze Cytoplasma, kann der Nucleolus für den übrigen Kerninhalt zum Mittelpunkte strahliger Gruppirung werden. Beispiele hierfür hat Gruber (I, p. 124) bei Amoeba, Löwit (IV, p. 35) in Leucoblasten der Salamandermilz, O. Hertwig (I, p. 351, Taf. X, Fig. 1) an lebenden Keimbläschen von Toxopneustes beschrieben.

Endlich sei noch auf die Ranvier'schen Netze bei der Blutgerinnung hingewiesen oder auf pathologische Fibringerinnungen, von denen z. B. Hauser (I, Taf. VIII, IX) sehr schöne Strahlungsbilder veröffentlicht hat, fast regelmässig liegt ein Leucocyt oder ein Gewebsfragment im Centrum der Sonnen.

Allen diesen verschiedenen Strahlungserscheinungen ist ein Merkmal gemeinsam: der morphologisch ausgestaltete Mittelpunkt, gleichviel ob er specieller als Centrosom, als Kern, als Nucleolus, als Chlorophyllkorn u. s. w. zu bezeichnen wäre und in der Zelle eine mehr active Rolle, wie man den Centrosomen sie gern zuschreibt, spielt oder mehr als untergeordnete Bildung, wie die Nucleolen, zu betrachten ist. Alle Strahlungsphänomene haben noch eine zweite Aehnlichkeit: sie sind der morphologische Ausdruck für lebhafte Umwälzungen in wichtigen Abschnitten des Zellenlebens. Am wenigsten wird diese Ansicht für die oben erwähnten Nucleolenstrahlungen und für manche ausgewachsene Pflanzenzellen zuzutreffen scheinen, aber doch nur scheinen, denn hier könnte vielleicht nur eine kurze Zeit vorher eine lebhaftere Thätigkeit gewaltet haben, an die eben nur noch die strahlige Gruppirung erinnert. Für die Strahlungen während der Kern- und Zelltheilung wird Niemand die obige Behauptung bestreiten wollen.

Ueber die Natur und Entstehung der Strahlungen ist schon viel geschrieben und gestritten worden, auch künstlich hat man dieses Phänomen nachzuahmen versucht. Die einen hatten dabei nur im Sinn, das morphologische Bild der Strahlung an unbelebten Materialien hervorzurufen, die anderen suchten die Kräfte, die hier einzugreifen schienen, aufzudecken.

Eine rein äusserliche Aehnlichkeit vermochte Henking (II, p. 28) dadurch hervorzurufen, dass er einen Tropfen Fixativ auf berusstes

Papier fallen liess. Es entstand eine Strahlungsfigur durch den von der Aufschlagsstelle des Tropfens ringsum gleichmässig wegstäubenden Alkohol. Liess man zwei Tropfen nahe bei einander gleichzeitig niederfallen, so entstand das Ebenbild einer Spindelfigur mit zwei Polen. Henking erkennt selbst an, dass er nur äusserlich nachahmen konnte, und meint (II, p. 38), „dass im Archoplasma durch die bei der Kerntheilung unzweifelhaft stattfindenden chemischen Processe lebendige Kräfte wirksam würden, welche einen ähnlichen Effect erzielen, wie die durch die Fallbewegung angesammelte Spannung“. Nähere Vorstellungen werden nicht entwickelt. Bütschli (II, IV) sah von kleinen, in erstarrender Gelatine (mit 0,3-proc. Chromsäure) eingeschlossenen Luftblasen Strahlen ausgehen, die bei genügender Nähe zweier solcher Bläschen auch zwischen ihnen sich ausspannten und so die karyokinetische Figur nachahmten. Da nach Bütschli's Anschauungen alle geronnenen Colloide ebenso wabig gebaut sind, wie das Protoplasma, so nimmt er an (II, p. 35, 36), dass die Strahlung durch Diffusionsvorgänge, die selbst von den Centrosomen hervorgerufen werden, veranlasst wird und zwar dadurch, dass das Wabenwerk des Plasmas resp. der Gelatine durch Zugwirkungen strahlig neu gerichtet wird. Bütschli's Deutung stellt sich gewissermaassen als ein Weiterbau seiner früheren (I, p. 414—418) Auffassung des Strahlungsphänomenes dar, neu fundamentirt durch die Wabentheorie. Der wabige Bau der Gelatine ist doch durch Bütschli's Untersuchungen noch keineswegs ausser allen Zweifel gestellt, und daher erscheint es wenig fruchtbar, Protoplasmastructuren wie die Strahlung mit einem Material nachzuahmen, dessen molecular-physikalischer Bau selbst noch der weiteren theoretischen Klarlegung bedarf. Man vergleiche die Besprechung der Wabentheorie.

Bütschli's Versuche wurden später von Rhumbler (I) wieder aufgenommen, ohne wesentlich Neues zu erreichen, denn Rhumbler ist unentwegter Anhänger der Wabentheorie und sucht die Strahlung genau wie sein Vorbild Bütschli zu erklären. Statt der Luftbläschen bettete Rhumbler (I, p. 561, Taf. XXVI, Fig. 4) auch kleine Stücken grün gefärbter, bereits erstarrter Gelatine in die noch verflüssigste ein und liess diese nun unter Pikrinsäure erstarren. Die Strahlungen, übrigens nach dem Autor (I, p. 558) „äusserst launenhaft“, setzten sich an die gefärbten Gelatinebrocken an. Da Rhumbler (I, p. 555) seiner Gelatine ein Gemisch von Eiweiss und Glycerin zusetzte und mit Pikrinsäure „conservirte“, so kommt er selbst auf die Vermuthung, dass eine fädige Gerinnung des Eiweisses die Strahlenbildung fördert und verdeutlicht. Ich glaube, dass hier wirklich diese Fällung des Eiweisses die Hauptsache war. Wurden Gypsstückchen oder Quecksilbertröpfchen in die Gelatine eingeschlossen, so setzten sich hieran keine Strahlen an, weil (I, p. 563) „die strahlenerregende Substanz eine besondere Adhäsion zu der Wandmasse (der Waben) besitzen muss“. Noch auf eine andere Weise gelang es Rhumbler (I, p. 563 Anmerk.), einmal eine schöne Strahlung zu erhalten: er legte ein durchbohrtes Deckglas auf Glyceringelatine, die auf einen Objectträger ausgegossen war, und versenkte dann diesen in Pikrinsäure. Diese erzeugte, durch das Deckglasloch hereindiffundirend, Strahlen. Auf ähnlichem Princip beruhen auch meine später zu schildernden Versuche mit Capillaren (vergl. 223).

Um die ganze Betrachtung von der Wabentheorie oder jeder

anderen Plasmatheorie frei zu halten, musste gezeigt werden, dass auch in Lösungen colloidaler Körper Strahlungen entstehen können, die den plasmatischen möglichst gleichen. Die Uebereinstimmung war zu erstreben sowohl in den Stoffen, aus denen die Strahlungen sich zusammensetzten, als auch den Agentien, die auf die Lösungen wirkten. Neben den Fixirungsmitteln mussten auch geringere Umschläge in der Reaction des Lösungsmittels geprüft werden. Alle diese Fragen liessen sich bequem nach der sogleich zu schildernden Methode untersuchen.

Zuvor noch einige Bemerkungen über diejenigen Arbeiten, welche durch Modelle die strahlenbildenden Kräfte veranschaulichen wollen. Ziegler (I, p. 79) verleiht der Ansicht derer, welche den Kern oder besonders das Centrosom für den Sitz anziehender oder abstossender Kräfte erklären, den nacktesten Ausdruck dadurch, dass er Magnete und Eisenfeilspähne zur Nachahmung mitotischer Bilder benutzt, die noch durch Hinzufügung chromosomenartig gebogener Drahtstücke vervollständigt werden. Zwar bekennt sich Ziegler (I, p. 78) als Gegner der später noch zu erwähnenden Muskelfadentheorie und nennt seine Auffassung dynamsich, aber seine Magnetversuche lassen doch klar erkennen, dass auch er im Centrosoma z. B. ein Centrum cytologischer Kräfte annimmt. Nur vermeidet er, die Angriffsbahn dieser Kräfte, die Andere in die contractilen Spindelfasern und Polstrahlen verlegen, näher zu bezeichnen. Ja, eine spätere Aeusserung Ziegler's (II, p. 264): „ich bin der Ansicht, dass die Strahlung auf einer Aenderung der Structur der Zellsubstanz beruht, vielleicht auf der Bildung radialer Fäden in dem Netzwerk oder auf einer radiären Ordnung der Waben“, gleitet doch recht vorsichtig über die Oberfläche hin. Die Muskeltheorie, die eine „vollkommene Analogie der Zellen- und Muskelfibrille“ annimmt, hat Heidenhain (V) mit seinem Modell aus einer Stahlschiene mit centralem Ring und zwischen beiden ausgespannten Gummifäden in gröbster Form versinnbildlicht. Die Mechanik der Mitose, die Heidenhain mit seinem Modell zu erläutern versucht, ruht auf zwei Annahmen, für die freilich Heidenhain den Beweis noch schuldig ist, wesshalb seine Ausführungen ja vielfach und mit Recht angegriffen werden. Die eine Voraussetzung ist die, dass in der Zelle stets ein centrirtes System gespannter, contractiler Strahlen oder sie vertretender, histologisch nicht wahrnehmbarer Plasmagruppirungen vorhanden ist und dass dieses System alle Inhaltsverschiebungen der Zelle beherrscht. Die andere, noch zu beweisende Annahme, ohne die Heidenhain's Modell nicht functionirt, ist die, dass jene centrirten Radien der Zelle sowohl am Mikrocentrum als auch im peripheren Protoplasma (= Stahlschiene des Modells) feste Stützpunkte haben. Selbst die subtilste histologische Analyse des Cytoplasmas wird hierfür keine Anhaltspunkte gewähren. Auf die Ursachen der Strahlenbildung nimmt das Modell keine Rücksicht, da es die Strahlen als gegeben voraussetzt und nur ihre Verschiebungen während der Mitose und die damit gegebenen Veränderungen des Zellinhaltes reproduciren will. Eine mechanische Nachlese zu dem Modell Heidenhain's hat R. Fick (I) veranstaltet, wobei sich so viele mechanische Ungenauigkeiten und Fehlschlüsse Heidenhain's ergaben, dass auch nach dieser Seite hin sein Modell den Ansprüchen einer Cytomechanik nicht genügen würde.

Kapitel I. Künstliche Strahlungen in Hollundermark.

I. Methodik.

Injection des Markes und Beobachtung. Sehr leicht gelingt es, selbst grössere Stücke des Markes mit den nicht coagulirenden Lösungen der Albumosen dadurch zu injiciren, dass man die Lösungen mit den Markstücken in kleinen, mit Wattepfropf verschlossenen Kölbchen im Dampfsterilisator ca. 1 Stunde kocht. Nach dem Erkalten sieht man schon daran, dass die Markstücke untergesunken sind und die Farbe der Lösung angenommen haben, dass die Injection vollständig ist. Es empfiehlt sich, ca. 5—6 mm hohe quadratische Prismen von 2—3 mm Breite aus dem trockenen Hollundermark mit dem Rasirmesser herauszuschneiden und in der angegebenen Weise zu injiciren. Diese Prismen befreit man durch kurzes Rollen auf Fliesspapier von der anhaftenden Lösung und wirft sie auf 12—24 Stunden in das Fixirungsmittel. Nach gründlichem Auswaschen stellt man mit dem Rasirmesser genügend dünne Schnitte her.

Einbettung in Paraffin ist nicht zu empfehlen, weil die feinen, fast „in der Luft schwebenden“ Strahlungen hierbei leicht zerstört oder doch so verschoben werden, dass die ursprüngliche Schönheit des Bildes ganz verloren geht. Um Dauerpräparate herzustellen, lege man die fixirten Prismen in steigende Concentrationen von Glycerin und mache dann erst die Rasirmesserschnitte, die dann in Glyceringelatine eingeschlossen werden. Ganz ohne einige Störung der Strahlungsbilder wird es aber gewöhnlich nicht abgehen.

Es ist desshalb das Beste, die Einwirkung des Fixirungsmittels unmittelbar unter dem Mikroskop zu verfolgen. Aus den injicirten Markprismen fertigt man dünne Schnitte, die ungefähr eine Dicke von 160 μ haben können und nicht dünner als 90 μ sein dürfen. Die Markzellen sind 85—150 μ hoch, Durchmesser ca. 250 μ. Will man also eine ganze Schicht unverletzter Zellen haben, so mache man ca. 160 μ dicke Schnitte, begnügt man sich mit einigen, so schneide man 90 μ dick. Für die feinere Beobachtung, die doch auf eine Zelle sich beschränken muss, sind möglichst dünne Schnitte zu nehmen, die bei 90 μ auch mit der Oelimmersion alle Einzelheiten des Strahlenanschiessens erkennen lassen.

Die Schnitte aus dem injicirten Mark saugt man leicht mit Fliesspapier ab, legt sie auf dem Objectträger in einen Tropfen der Fixirungsflüssigkeit, bedeckt mit Deckglas und stellt eine intacte Zelle ein, wobei man darauf zu achten hat, dass ein schattenhaft zarter Inhaltsrest der sonst leeren Markzelle, der zum Ausgangspunkt der Strahlung werden soll, gut zu sehen ist. Ueber diesen kernähnlichen Rest vergleiche man den Abschnitt über den Bau des Markes, Man kann in der angegebenen Weise unmittelbar unter dem Mikroskop die Strahlungen entstehen sehen, daneben auch die Fällungskraft der verschiedenen Fixirungsmittel, gemessen an der Zeit, die bis zum Erscheinen der Strahlen verstreicht, bestimmen. Hierauf wurde schon p. 26 hingewiesen. Auch noch auf andere Weise ist diese Fällungskraft messbar, nämlich durch die untere Grenzconcentration, die in einer gegebenen Albumoselösung noch Strahlen erzeugt (vergl. p. 212).

Wenn diese, wie bei stärkerem Sublimat oder Pikrinsäure, sehr schnell entstehen, so dass sie schon fertig sind, bevor das Mikroskop

passend eingestellt ist, so lege man die injicirten Schnitte in wenig Wasser und setze nach der Einstellung am Rande des Deckglases das Fixirungsmittel zu.

Alle coagulirenden Lösungen kann man begreiflicherweise nicht im Dampfsterilisator injiciren; die hoch colloidalen Stoffe lassen sich auch nicht unter der Luftpumpe in dünne Schnitte des trockenen Markes einsaugen. Leicht kommt man zum Ziel, wenn man Markprismen von der oben angegebenen Grösse durch einstündiges Kochen im Sterilisator zunächst mit Wasser injicirt, dann dünne Schnitte macht und diese nun $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde unter der Luftpumpe mit den betreffenden Eiweisslösungen füllt. Da diese meist schwach alkalisch oder absichtlich schwach sauer waren, so ist zu bedenken, dass viele Eiweisskörper schon beim Verdünnen mit Wasser schwach ausgefällt werden. Wenn also die Markschnittchen mit Wasser vorher imprägnirt worden sind, tritt zuweilen schon beim Injiciren unter der Luftpumpe einfach nur infolge der Verdünnung des Lösungsmittels eine Ausfällung ein. Will man diese vermeiden, so legt man die wasserhaltigen Schnittchen auf kurze Zeit in das betreffende Lösungsmittel (Alkali oder Säure) der später zu injicirenden Eiweisslösung. Die ganzen Markprismen anstatt mit Wasser mit diesem Lösungsmittel zu injiciren, hat sich besonders bei Alkalien (0,2-proc. KOH) nicht als vortheilhaft erwiesen, wegen der dadurch hervorgerufenen starken Quellung der Cellulosemembranen.

Die mit coagulirenden Lösungen imprägnirten Schnittchen müssen natürlich ebenfalls auf Fliesspapier leicht abgetupft werden, bevor man sie in die Fixirungslösung legt.

Man halte immer die hier vorgeschlagene Reihenfolge ein, injicire die Eiweisslösung und fixire dann. Denn wenn man das Fixirungsmittel in das Mark, Prismen oder dünne Schnitte, injicirt und nun z. B. in Albumose einlegt, so diffundirt diese zu langsam, um deutliche Strahlungen zu geben, auch dringt sie und erst recht Albumine und dergleichen zu langsam durch die Wand der Markzellen. Gerade das schnelle Einströmen und Vordringen der Fixirungsmittel in die Eiweisslösung, so dass sie schneller an den Inhaltsrest des Markes anstossen, als die Ausfällung beginnt, ist, wie sich noch herausstellen wird, eine Grundbedingung für die Strahlung.

Bau und Entwicklung des Markes. Das Hollundermark ist, wie allbekannt, ein todtes Gewebe und enthält in seinen Zellen keine Protoplasmakörper mehr. Die allverbreitete Annahme, dass es vollkommen leer ist, gar keine Reste seines einstigen Zellinhaltes mehr birgt, ist aber nicht richtig. Die Literatur ist sehr arm an Untersuchungen über das Mark der Pflanzen und mit den neueren Hilfsmitteln der mikroskopischen Technik ist seine Reifung noch nicht verfolgt worden. In einer älteren Arbeit von Gris (I. p. 58) wird die Frage kaum gestreift. Es würde wohl jeder Botaniker ohne Bedenken die Markzellen als vollkommen leer gelten lassen. Und doch liegt in jeder Markzelle ein schattenhafter, blasser, verwaschen umgrenzter Ballen, der durch sein Grössenverhältniss zur ganzen Zelle sofort an einen Zellkern erinnert (Fig. 9*a*, p. 210, besonders Fig. 12, p. 217). Dieser Inhaltsrest, der wirklich die Kernruine der reifen Markzelle und unentbehrlich für die Strahlenbildung ist, wurde in meiner vorläufigen Mittheilung (I) fälschlich als eine Neubildung gedeutet. Ganz verfehlt war aber damals meine Auffassung nicht,

weil in der That statt dieses Kernrestes auch eine vollständige Neubildung, eine bläschenförmige Niederschlagsmembran zum Centrum von Strahlen werden kann (Fig. 11, p. 214), freilich nur unter gewissen Bedingungen, über die später berichtet werden soll (p. 218). Man hat diese seltenen Strahlungen wohl von denen zu unterscheiden, die um den Kernrest entstehen.

Auch das reife Mark anderer Hölzer und Holzstauden (z. B. Ailanthus glandulosa, Hydrangia hortensia, Sylibum Marianum, Helianthus annuus und tuberosus) enthält in jeder Zelle einen Kernrest und eignet sich daher ebenfalls zur Erzeugung von Strahlungsfiguren. Nur im Mark der Spiraea callosa fehlte der Kernrückstand und desshalb entstanden auch hier keine Strahlungen, sondern gleichmässige Niederschläge.

Durch 3-stündige Behandlung mit concentrirter Essigsäure oder schneller noch durch 1-stündiges Kochen damit, werden die Kernreste aus dem Hollundermark vollkommen gelöst. Die Essigsäure wasche man 1—2 Tage tüchtig aus, trockene dann die Hollundermarkprismen und benutze sie zur Injection der Albumoselösung. Man wird jetzt in den restfreien Zellen niemals Strahlungen erscheinen sehen.

Der Kernrest ist im übrigen recht widerstandsfähig, er verändert sich gar nicht bei 24-stündiger Einwirkung von concentrirter Salzsäure, 5-proc. Schwefelsäure, 5-proc. Kalilauge, 20-proc. Soda, Ammoniak, alles bei Zimmertemperatur. Kochende verdünnte Essigsäure (1,5-, 10-, 20-proc.) löst entweder gar nicht oder nur unvollständig. Ausser dem Kernrest ist keine weitere Spur des früheren Inhaltes nachweisbar, die Strahlungen sind wirkliche, echte und untrügliche Neubildungen. Für ihre Entwicklung scheint auch die Structur der Zellwand auf den ersten Blick bedeutungsvoll. Die Cellulosewand ist zwar ringsum geschlossen, trägt aber eine grosse Zahl dünnerer Wandstellen von kreisförmigem oder elliptischem Umriss, die sogenannten Tüpfel. Wenn auch durch sie die Fixirungsmittel schneller eindringen können, als durch die übrige dickere Membran, so ist doch, wie sich noch herausstellen wird, diese Wandstructur nicht als Grundbedingung der Strahlung anzusehen.

Es ist noch entwicklungsgeschichtlich zu beweisen, dass der verwaschene Inhaltsrest der Markzellen wirklich vom Zellkern stammt, wirklich eine Kernruine ist. Man wird beinahe in jedem Schnitte durch reifes Mark ein oder auch einige Zellen antreffen, in denen nicht ein, sondern zwei solche Kernreste vorkommen, zwischen denen sich ebenfalls Strahlen ausspannen, so dass das schönste Abbild der karyokinetischen Figur entsteht (Fig. 13, p. 222). Dass auch hier wirklich nur Kernreste vorliegen, erkennt man leicht daraus, dass das junge Mark diesjähriger Zweige im April und Mai innerhalb des noch nicht geschwundenen Cytoplasmas oft zwei Kerne in einer Zelle enthält. Bald liegen die beiden Kerne horizontal neben-, bald übereinander, als Zeichen dafür, dass eine Längs- oder eine Querwand nicht ausgebildet worden ist. Schon in sehr jungen Internodien, deren Mark erst in einigen Monaten ganz ausreift, wird man leicht solche zweikernige Zellen bemerken. Ob durch weitere Kerntheilungen die Zahl noch höher steigen kann, wurde nicht näher untersucht, es ist dies aber sehr wahrscheinlich, weil auch drei annähernd gleich grosse Reste ausnahmsweise übrig bleiben.

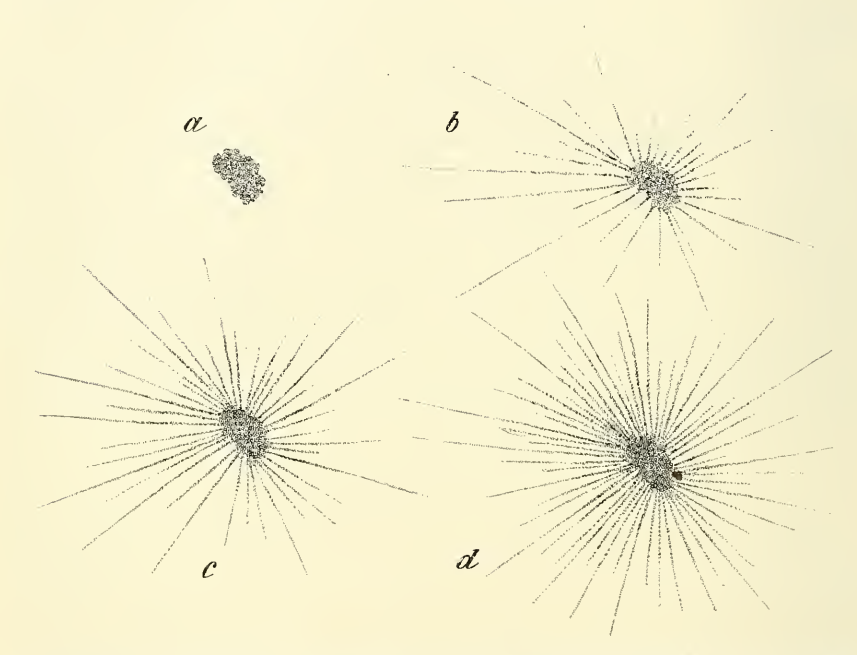
In einjährigen Zweigen war im October des ersten Jahres bereits alles Cytoplasma der Markzellen geschwunden, nur der Kernrest war geblieben. Das Mark reift also im ersten Jahre, in den Monaten Juni—October wird das Cytoplasma allmählich herausgelöst und entfernt und nur der Kern bleibt zurück, er verliert seinen scharfen Umriss und schrumpft zu dem schon beschriebenen Ballen zusammen. Es dürfte sich wohl empfehlen, diese sonderbare Erscheinung einmal genauer zu verfolgen und mit ähnlichen Vorgängen im Pflanzenreich zu vergleichen. Allgemein ist ja bereits die Regel von Schmitz ausgesprochen worden, „dass der Zellkern das letzte Gebilde ist, das aus einem im Lebensprocess verbrauchten Zellleib schwindet" (vergl. Strasburger VI, p. 242), z. B. bei der Gefässentwicklung. Aber hier soll der Kern schliesslich ganz verschwinden, während es doch wahrscheinlich ist, dass er wie im Hollundermark als zarter Ballen zurückbleibt.

Ebenso schnell wie bei Sambucus muss natürlich in den einjährigen Holzstauden (Sonnenrose und andere) das Mark in wenigen Monaten ausreifen. Im Herbst findet man stets nur noch den Kernrest, das ganze Cytoplasma ist vollkommen verschwunden. Ausserordentlich zäh bleiben nun aber diese Kernreste in dem Mark stecken, z. B. waren sie noch in allen Zellen eines ca. 11-jährigen Hollunderstammes zu finden und gaben auch allgemein Strahlungen. Ja ein Vergleich der Kernreste dieses 11-jährigen Stammes mit denen im Mark von 8-, 3- und 2-jährigen Zweigen liess keine Verminderung erkennen, so dass es scheint, als ob diese Kernreste, abgesperrt von aller Säftecirculation in der Pflanze, unvergänglich wären. In der zartwolkigen, lockeren Grundmasse dieser Kernreste sind oft auch noch einzelne Körnchen eingebettet, die wohl als Reste von Nucleolen oder „Chromatinkörnchen" zu deuten sind.

II. Versuche mit Deuteroalbumose.

1) Grundversuch mit 3-proc. schwach saurer Deuteroalbumose und 1-proc. Osmiumsäure. Da die Osmiumsäure nicht augenblicklich wirkt, so hat man vollständig Zeit, mit der Oelimmersion eine unverletzte Markzelle mit gut sichtbarem, möglichst central gelegenen Kernrest aufzusuchen, nachdem der injicirte Schnitt in die Osmiumsäure gelegt worden ist. Nach einer halben Minute spätestens kann die Einstellung beendet sein. Man wird jetzt nur den Kernrest wahrnehmen, umgeben von der klaren Albumoselösung, in der noch keine Spur einer Fällung zu bemerken ist (Fig. 9*a*). Sieht man scharf zu, so wird man nach 2—3 Minuten die ersten Strahlen als äusserst zarte, homogene oder feingekörnte Fäden anschiessen sehen. Einige reichen bereits bis an die Zellwand, andere dringen nur eine kurze Strecke in die Albumoselösung peripherwärts vor. Die Strahlen beginnen an der Oberfläche des Kernrestes und wachsen rasch in radialer Richtung sich verlängernd bis zur Zellwand heran (Fig. 9*b*). Wenige Minuten später haben sie sich unter den Augen des Beobachters vermehrt, immer zahlreicher werden diejenigen Strahlen, die bereits bis zur Zellwand vorgedrungen sind und immer wieder schieben sich neue, noch kurze Strahlenanfänge ein (Fig. 9*c*). Nach einer Stunde ungefähr ist die Strahlensonne, die von dem Kernrest nach allen Seiten sich ausbreitet,

vollendet (Fig. 9*d*). Der einzelne Strahl ist feinpunktirt von kleinen Körnchen aus Osmiumalbumose, die auf einem homogenen, dünnen Faden aufgereiht erscheinen. In solcher Reinheit kann man das Strahlungsbild unter einer feuchten Glocke mehrere Tage erhalten, nur trübt allmählich die Osmiumschwärzung und auch weitere Ausfällung zwischen den Strahlen das Bild. Setzt man am Rande des Deckglases vorsichtig einen kleinen Tropfen Glycerin zu und lässt so langsam durch Diffusion und weiterhin durch Verdunstung des Wassers das Glycerin sich in dem Präparate concentriren, so gelingt es, die zarten Strahlungen auch in Glyceringelatine als Dauerpräparat einzubetten. Statt der reinen Osmiumsäure könnte man auch ALTMANN's Gemisch zu dem Versuche verwenden.



Fie. 9. Fremdstrahlung von 2,5-proc. Deuteroalbumose, schwach sauer, mit 1-proc. Osmiumsäure; unmittelbar unter Mikroskop beobachtet. *a* Der Kernrest der Hollundermarkzelle, noch ganz strahlenfrei, sogleich nach dem Einlegen der Schnitte in die Osmiumsäure, 11 h. 16. *b* Strahlung nach 4 Minuten (11 h. 20), viele Strahlen noch kurz, peripheriewärts wachsend. *c* Anreicherung der Strahlung, 14 Minuten nach Beginn des Versuches (11 h. 30). *d* Vollständige Strahlensonne (12 h. 16). Vergr. 600.

Es ist verlockend, an dieser Stelle auf die Schilderung zu verweisen, die O. HERTWIG (I, p. 380) vor mehr als 20 Jahren von der Spermastrahlung im befruchteten Ei von Toxopneustes gegeben hat. In dem lebenden Ei tauchte nahe der Oberfläche ein heller Fleck und um diesen die Strahlung auf, die, anfangs kurz, sehr schnell, in wenigen Minuten, 10—15 Minuten nach der Befruchtung das ganze Ei durchstrahlt (I, Taf. II, Fig. 7, 8). Gleichzeitig rückte der helle Fleck mitsammt seiner Strahlenkrone ins Centrum des Eies, ungefähr in 5 Minuten. Die äusserliche Uebereinstimmung mit unserem Grund-

versuche ist so auffällig, dass ein näherer Vergleich der beiden Erscheinungen sich von selbst aufdrängt. Zunächst aber noch weitere Versuche.

2) Grundversuch mit 3-proc. schwach alkalischer Deuteroalbumose und 1-proc. Osmiumsäure. Die Osmiumsäure fällt nach p. 12 die alkalische Lösung nicht und gewährt uns dadurch reichliche Zeit, eine gute Stelle im Präparat auszuwählen. Man könnte 24 Stunden beobachten, ohne auch nur den leisesten Anfang einer Strahlung zu entdecken. Sobald nun aber ein Tröpfchen Essigsäure (5-proc. etwa) durchgesaugt und dadurch die Reaction umgekehrt wird, beginnt die Strahlung anzuschiessen in derselben Zeit wie bei Versuch 1.

Säuert man kurze Zeit, $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde nach dem Einlegen in die Osmiumsäure an, so sind die Strahlungen ebenso rein und schön wie bei der Fällung saurer Albumoselösungen. Nur beginnt bald auch zwischen den Strahlen eine Ausfällung. Wartet man mit dem Ansäuern etwa 3 Stunden, eine mehr als genügende Zeit, damit die Osmiumsäure gleichmässig mit der Albumoselösung sich gemischt hat, so erscheint ein die ganze Zelle gleichmässiger erfüllender Niederschlag, der die anfangs auch sich bildenden Strahlungen sehr schnell verdeckt. Die beiden Versuche unterscheiden sich wesentlich dadurch, dass im ersten das wirkliche Fällungsmittel die Strahlung erzeugt, während in der alkalischen Lösung, die bereits die Osmiumsäure enthält, die Essigsäure das zu thun scheint. Nicht allein die Theorie der Fixirung, auch die allgemeine Protoplasmalehre kann hieraus manches ableiten. Man stelle sich vor, dass in einer Zelle zwei Stoffe, die nur in alkalischer Lösung nicht auf einander einwirken, enthalten seien und dass plötzlich eine Säure aus der Nachbarschaft eindringe: sogleich wird die verhaltene Reaction beginnen und z. B. zu einer Ausfällung, vielleicht sogar in strahliger Anordnung um den Zellkern führen können. Anderseits wird man auch bei der mikrochemischen Untersuchung mit Säuren und Alkalien sehr vorsichtig im Urtheil sein müssen, weil Fällung und Lösung, die scheinbar durch sie hervorgebracht werden, auf ähnlichen Ursachen beruhen könnten, wie der Vorgang im Versuch 2.

3) Versuche mit anderen Fixirungsmitteln. Alle früher aufgezählten Stoffe, die Deuteroalbumose nur in saurer Lösung fällen, also ausser Osmiumsäure auch Kaliumbichromat und Altmann's Gemisch beider eignen sich ebenfalls zu den soeben beschriebenen Versuchen. Die „sauren" Fixirungsmittel überwinden die alkalische Reaction der Albumoselösung auch in den Markversuchen verschieden gut und geben demgemäss bald bessere, bald schlechtere Strahlungsbilder. In schwach saurer Lösung wird aber die Albumose von allen Fixirungsmitteln, die sie überhaupt ausfällen, auch strahlig abgeschieden, sobald sie nicht allzu stürmisch wirken, was sich durch geeignete Verdünnung vermeiden lässt. Dass selbst so heftig fällende Lösungen, wie 7-proc. Sublimat, beim Eindringen Strahlungen erzeugen müssen, ist wohl selbstverständlich, aber die Zeitdauer, während der sie zu sehen sein würden, ist so verschwindend klein, dass wir mit unserer Beobachtung nicht nachkommen oder richtiger gesagt, dem Ansturm des Fixirungsmittels nicht zuvorkommen können.

Die Fällungskraft der gebräuchlichsten Fixirungsmittel gegenüber schwach saurer 3-proc. Albumoselösung (NB. selbst-

verständlich einer und derselben Lösung) erkennt man aus der Schnelligkeit, mit der die ersten Strahlen und schliesslich die allgemeine Strahlung erscheinen. Es ergeben sich zwei Gruppen, die eine fällt sofort, das Strahlenbild ist in 1—2 Minuten schon complet, die andere braucht 2—4 Minuten für die ersten Strahlen und vielleicht 10 Minuten, um eine annähernd vollständige Strahlensonne zu erzeugen. Zur ersten Gruppe, mit grosser Fällungskraft gehören: 0,5-proc. $HgCl_2$, 1-proc. $PtCl_4$, 0,5-proc. Pikrinsäure, 0,5-proc. Chromsäure, die Lösungen von HERMANN, FLEMMING, Alkohol. In die zweite Gruppe sind zu stellen: Jodjodkaliumlösung, 10-proc. Formaldehyd, Osmiumsäure, Kaliumbichromat, ALTMANN's Gemisch.

Ein feineres Maass für die Fällungskraft gewährt noch die Concentration, die eben noch genügt, um in 3-proc., schwach saurer Albumoselösung eine allseitig strahlenreiche Sonne zu erzeugen, wobei noch die Zeit zu berücksichtigen ist, die bis zum Erscheinen der ersten Strahlen verstreicht. Einige Versuche, deren Genauigkeit sich freilich noch hätte steigern lassen, sind in folgender Tabelle vereinigt. Unter „erste Strahlung“ und „allgemeine Strahlung“ sind die Minuten verzeichnet, nach denen der entsprechende Zustand, vom Beginn des Versuches ab, eingetreten war.

Fällungskraft gegenüber schwach saurer 3-proc. Deuteroalbumose.

Fixirungsmittel		Erste Strahlung	Allgemeine Strahlung
Sublimat	7 - proc.	sofort allgemeine Fällung, Strahlung verdeckt	
„	1 „	sofort	sofort
„	0,5 „	„	3—5 Minuten
„	0,1 „	„	3—5 „
„	0,05 „	2 Minuten, aber keine weitere Zunahme der Strahlung	
„	0,01 „	wie 0,05-proc.	
„	0,001 „	nach einigen Minuten ein dürftiger Anfang, Fällung fast 0	
Pikrinsäure	0,5 „	sofort	sofort
„	0,2 „	2—3 Minuten	4—5 Minuten
„	0,1 „	2—3 „	nicht mehr allgemein
„	0,05 „	keine Fällung mehr	
Platinchlorid	1 „	sofort	1—2 Minuten
„	0,5 „	„	1—2 „
„	0,1 „	langsam, in 12 Minuten ganz vereinzelte, undeutliche Strahlungen	
Osmiumsäure	1 „	2—3 Minuten	8—10 Minuten
„	0,1 „	2—3 „	8—10 „
„	0,05 „	keine Strahlung mehr	
Alkohol	96 „	sofort allgemeine, strahlenlose Fällung	
„	72 „	„ „ „ „	
„	48 „	nach 2—5 Minuten einige Strahlungen; sonst nichts	
„	24 „	nach 10 Minuten einige, wenige Strahlungen; sonst nichts.	

Das Sublimat ist hiernach unbedingt das überlegenste Fällungsmittel für Albumose und auch für viele andere Eiweisskörper. Würde man diejenige Concentration, die noch sofort Strahlung und in wenigen Minuten eine allgemeine Strahlensonne erzeugt, also 0,1-proc. = 1 setzen, so wäre vergleichsweise die Pikrinsäure und das Platinchlorid nur

mit $^1/_5$ ungefähr abzuschätzen. Die Osmiumsäure hinkt bedeutend nach. Es liesse sich jedenfalls durch weitere Versuche ein relativer Fällungscoefficient für die Fixirungsmittel bestimmen.

Um zierliche Strahlungsbilder hervorzurufen, muss man bei Sublimat schon auf 0.5 oder 0,1 Proc. herabgehen, Pikrinsäure befriedigt bei 0.2 Proc., Platinchlorid bei 1 Proc. (Fig. 10 *a*—*c*). Steigt man höher, so werden die Strahlungen sehr plump und sind oft reichlich mit Ausfällungen seitlich behangen, wie Fig. 10 *a* auch noch für 0,5 $HgCl_2$ veranschaulicht. Ebenso verlangt auch der Alkohol eine

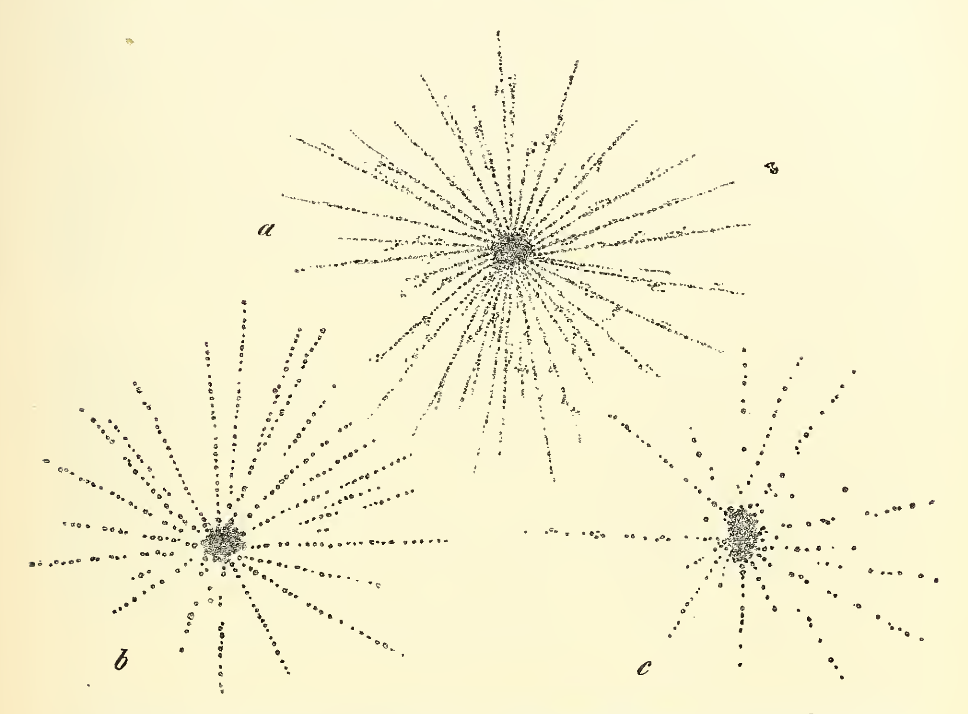


Fig. 10. Fremdstrahlungen aus Deuteroalbumose 4-proc., eben sauer, in Hollundermark, um den schwärzlich punktirten Kernrest. *a* 0,5-proc. Sublimat, sofort erscheinend. *b* 0,2-proc. Pikrinsäure. *c* 1-proc. Platinchlorid. Nähere Beschreibung im Text p. 213. (Vergr. 600.)

ansehnliche Verdünnung, auf ca. 50 Proc., aber selbst 24 Proc. ruft noch in einigen Zellen schöne Strahlungen, die natürlich auf Wasserzusatz sofort zerfliessen, hervor. Umgekehrt bedarf es bei Formaldehyd einer Concentration von 10 Proc., um in 20 Minuten allgemeine Strahlung zu erzeugen, 4 Proc. versagt schon und gibt unschöne Bilder.

Die Strahlen, die durch verschiedene Fixirungsmittel in geeigneter Concentration um den Kernrest anschiessen, sind nicht gleich gebaut. So bestehen sie z. B. bei 1-proc. $PtCl_4$ (Fig. 10 *c*) eigentlich aus weiter nichts, als aus einer Reihe locker an einander gelagerter, kleiner Granula, die durch ihr moleculares Zittern schon verrathen, dass sie nicht einer homogenen Grundlage angesetzt sind. Aehnlich sehen die Pikrinsäure-Strahlen (Fig. 10 *b*) aus. Die Sublimatstrahlung dagegen

(Fig. 10 *a*) erscheint solider gebaut, hier ist eine continuirliche Axe, der die Granula aufgereiht sind, schon deutlicher erkennbar. Alle diese Einzelheiten hier noch weiter aufzuzählen, ist belanglos, weil sie doch das allgemeine Problem der Strahlenbildung nur wenig berühren.

Dass auch umgekehrt bei gleicher Stärke des Fällungsmittels die Concentration der Albumoselösung von Einfluss auf die Schnelligkeit und Schönheit der Strahlenbildung ist, bedarf wohl nur eines kurzen Hinweises. So werden aus 10-proc. Albumose von 1-proc. Osmiumsäure ausserordentlich plump granulirte Strahlungen erzeugt.

4) Karyokinetische Figuren entstehen, sobald 2 oder noch seltener 3 Kernreste in einer Markzelle liegen (Fig. 13, p. 222). Näheres hierüber in dem Abschnitt über die Ursachen der Strahlenbildung.

5) Strahlungen um Bläschen aus Niederschlagsmembran (Fig. 11) habe ich bis jetzt nur mit Altmann's Kaliumbichromat-Osmiumgemisch erhalten, wohl desshalb, weil dieses mehr als andere Fixirungsmittel, mit Albumose Niederschlagsmembranen gibt. Wenn eine solche bläschenförmig von der Zellwand aus sich in die Albumoselösung vorwölbt (Fig. 11), so wirkt nun die Ober-

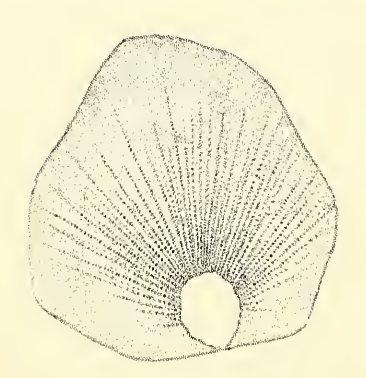


Fig. 11. Fremdstrahlung um ein Bläschen aus Niederschlagsmembran. Zelle aus einem mit $2^1/_2$-proc., eben saurer Albumoselösung imprägnirten Hollundermarkprisma, das 20 Std. in Altmann's Bichromat-Osmiumgemisch gelegen hatte. Dieses Fixirungsmittel gibt sehr schöne Niederschlagsmembranen, von denen eine sich bläschenförmig in das Zelllumen vorgewölbt hat. Die Oberfläche dieser Niederschlagshaut hat als Wecker für die Strahlungen gedient, über deren Entstehung man den beifolgenden Text vergleichen wolle. Das sehr engmaschige Gerüstwerk, das die Strahlungsfigur umschliesst, besteht aus der übrigen, feinglobulitisch ausgefällten Albumose. (Vergr. 330.)

fläche dieses Bläschens genau wie der Kernrest als Fremdkörper und als Wecker für die später beginnende Ausfällung. Es entsteht auch hier eine Fremdstrahlung, denn die Niederschlagsmembran verhindert zweifellos den Durchtritt der Altmann'schen Lösung, die also nur noch durch die Zellwand der Markzelle in die Albumoselösung eindringen kann. Die Strahlen wachsen also ebenfalls von dem Bläschen aus zur Peripherie, genau wie vom Kernrest und sind auch so zu erklären, nicht etwa dadurch, dass die Altmann'sche Lösung die Niederschlagsmembran passirt und sogleich bei ihrem Uebertritt in die Albumoselösung „strahlend“ sich ausbreitet. Im Gegentheil: es muss das Fixirungsmittel von der ganzen Zellperipherie aus erst bis an das Bläschen herandiffundirt sein, bevor die rückläufige Strahlungsfällung beginnt. Näheres hierüber im Abschnitt über die Ursachen der Strahlenbildung.

Der eben besprochene Fall ist sicher besonders interessant, weil er zeigt, wie ein kernähnliches Bläschen mit Strahlen und dazwischen ausgefälltem, protoplasmaähnlichen Gerinnsel, das aus der übrigen Albumose besteht, sich künstlich erzeugen lässt.

6) Strahlung von Albumose in erstarrter Gelatine (Fig. 13 *a*, p. 222) wird in dem Abschnitte über die Polymorphie der Eiweisskörper, Mischstructuren, beschrieben werden.

III. Versuche mit anderen Eiweisskörpern.

Die Fähigkeit, in Hollundermark zu strahlen, beschränkt sich keineswegs auf die Albumose und auch nicht auf gewisse Gruppen von Eiweisskörpern, die als specifische Strahlenbildner neben die Granula- und Gerinnselbildner sich stellen liessen. Alle Eiweisskörper, die untersucht wurden, sind zur Strahlenbildung geeignet, nur bedarf es oft besonderer Bedingungen. Mit den üblichen Fixirungsmitteln erhält man in sauren oder alkalischen Lösungen von Albumin, Globulin, Casein und Conglutin, sowie Nucleinsäure stets einige Strahlungen, nur werden diese sehr schnell verdeckt durch die schnell folgende weitere Fällung. Ja, sehr oft fehlt die primäre Strahlung ganz, weil das Fixirungsmittel, sobald es überhaupt in die Zelle eintritt, sofort stark fällt. Es entstehen winzige, lebhaft molecular tanzende Globuliten, die sich schnell zu gerüstigen Structuren zusammenlagern. Gerade die augenblickliche Fällungswirkung verhindert, wie wir noch sehen werden, die reine Strahlung. Dennoch gelingt es auch, mit Fixirungsmitteln schöne Strahlungen zu erzielen. So entstanden durch Fällung von 2-proc. Serumalbumin mit FLEMMING'scher Lösung sehr schöne Bilder, von denen das eine, zwischen zwei Kernresten karyokinetisch sich einlagernd, in Fig. 13 *c* (p. 222) dargestellt ist. Die kleinen Fädchen-Gerinnsel würden bei dichterer Lagerung zu einem Gerüstwerk sich an einander gelegt haben. Ferner gab Serumalbumin (schwach sauer) recht schöne Strahlungen mit Osmiumsäure, LUGOL'scher Lösung und 48-proc. Alkohol. Hämoglobin, in ca. 1-proc. wässriger Lösung strahlte mit Osmiumsäure, LUGOL'scher Lösung, Kaliumbichromat, 1-proc. Kupfervitriol, 4-proc. Formaldehyd, FLEMMING'scher Lösung, 0,2-proc. Pikrinsäure. Nuclein gab einige gute Strahlungen mit Platinchlorid oder mit Chromsäure; Globulin (sauer) mit Osmiumsäure.

Diese Beispiele werden genügen. Sie weiter zu verfolgen, ist unnöthig, weil es noch auf eine andere, für die ganze Protoplasmalehre viel wichtigere Weise gelingt, die Gerinnselbildner, um die es sich ja jetzt vorwiegend handelt, zur Strahlung zu bringen.

Strahlung durch Verdünnung und Neutralisirung. Die Globuline fallen aus schwach alkalischen oder sauren Lösungen schon beim Verdünnen mit Wasser aus, weil sie in reinem Wasser unlöslich sind und einen gewissen Gehalt an Säure oder Alkali zur Lösung fordern. Hat man diesen von Anfang an möglichst niedrig genommen, so ist es leicht, durch Verdünnen die Fällung herbeizuführen. Mit dem Albumin theilen aber weiterhin die Globuline die Eigenschaft, aus schwach basischen oder sauren Lösungen vorübergehend beim Neutralisiren auszufallen, um dann im Ueberschuss der neutralisirenden Lösung, also nach dem Umschlag der Reaction, sich wieder zu lösen. Im Reagenzglas erkennt man das, wie bekannt, an der vorübergehenden Trübung der Lösungen, die oft sehr schnell wieder verschwindet, wenn man nicht ganz präcis den Neutralisationspunkt getroffen hat.

An diese Eigenschaften der Globuline und Albumine hatten sich weitere Strahlungsversuche anzulehnen. Sehr einfach ist die Strahlung

durch Verdünnung von Globulinlösungen herbeizuführen. Man koche Hollundermark mit reinem Wasser und injicire nun unter der Luftpumpe in die Schnitte eine schwach saure oder schwach alkalische Lösung von Serumglobulin, vielleicht 0,5 Proc., das man entweder in 0,2-proc. Kali oder in 0,2-proc. Essigsäure gelöst hat. Die Lösungen dürfen auch noch verdünnter sein. Hat man $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde unter der Luftpumpe injicirt und untersucht nun die Markschnitte in der Globulinlösung, so wird man in zahlreichen Zellen die prachtvollsten Strahlungen finden. Diese Injectionsstrahlungen erklären sich leicht dadurch, dass die eindringende, saure oder alkalische Globulinlösung durch das in den Markzellen enthaltene Wasser verdünnt und damit unter jenen Grad der Säure oder Alkalescenz gebracht wird, der zur Lösung des Globulines erforderlich ist.

Auch in Albuminlösungen wird man solche Injectionsstrahlen auftauchen sehen, aber nur wenn man recht schwache Säure, vielleicht 0,05-proc. Essigsäure, benutzte, die zu einer guten Lösung nicht ausreichte. Albumin und Globulin sind gleich vortheilhaft für die Neutralisirungsstrahlungen, nur muss man mit starken Verdünnungen der Säuren und Alkalien arbeiten und immer dabei bedenken, dass die Neutralisirung nur eine vorübergehende ist, bald wieder verschwinden kann und mit ihr auch die schönste Strahlung.

Sehr fesselnd gestaltete sich folgender Versuch. Ungefähr 1-proc. Serumalbumin war in 0,2-proc. Essigsäure gelöst und in Hollundermarkschnitte injicirt worden. Legte man diese in 0,1-, 0,2-, 0,3-, 0,4-, 0,5-proc. Kali oder auch in 0,05-proc., so entstand keine Fällung, weil das Alkali schon zu stark war. In 0,025-proc. Kali erschien sofort eine Fällung am Rande und in den inneren Zellen des Markschnittes auch nach 2 Minuten einige schöne Strahlungen, die in 20—30 Minuten wieder vollkommen gelöst waren, weil jetzt die ursprüngliche Säure wieder dominirte. Ganz allgemeine, zarte, aber sehr schöne Strahlungen aus homogenen Fäden mit aufsitzenden kleinen und grösseren Granulis erzeugte 0,0125-proc. Kali. Schon nach 10 Minuten blassten die Fäden und Körnchen wieder ab, das ganze Bild verschwand in wenigen Minuten unter den Augen des Beobachters. Es sei bemerkt, dass bei diesen Versuchen der injicirte Markschnitt zunächst auf Fliesspapier abgetupft und dann in die Kalilösung gelegt wurde. Später wurde davon nichts mehr zugesetzt, so dass also die im Schnitt enthaltene Säure mit dem unter dem Deckglas vorhandenen Kali sich auszugleichen hatte. Davon dringt natürlich nur wenig in die Zellen und wird schliesslich dort, nach vorübergehender Strahlung, wieder überneutralisirt.

Dieselben Versuche gelingen auch mit Globulin in saurer Lösung, nur hüte man sich hier vor schon vorhandenen Injectionsstrahlungen. Um Irrthum ganz zu vermeiden, ist es daher besser, die zunächst mit Wasser durchtränkten Markschnitte, wie schon p. 207 erwähnt, erst mit der verdünnten Essigsäure, die auch zur Lösung des Globulines dienen soll, zu injiciren und dann die Globulinlösung nachzusaugen. Die Schnitte sind dann ganz frei von irreleitenden Strahlungen und geben nun, wenn z. B. in 0,2-proc. $C_2H_4O_2$ gelöst worden war, in 0,05-proc. Kali in 2—3 Minuten die schönste Strahlung, die aber in wenigen Minuten wieder verschwindet. Selbst reines, destillirtes Wasser brachte in saurer Globulinlösung schöne und vollständige, zartfädige Verdünnungsstrahlungen hervor.

Solche Neutralisirungsstrahlungen lassen sich auch gut durch Fixirungsmittel conserviren. So war z. B. die schöne mitotische Nachbildung in Fig. 13 *b* (p. 222) dadurch entstanden, dass eine stark essigsaure Globulinlösung in dem Markschnitt mit 0,75-proc. Kali gefällt wurde. Sobald das Bild vollendet war, wurden die Schnitte in 1-proc. Platinchlorid geworfen, worin sich alles unverändert fixirte, weil kein gelöstes Globulin mehr vorhanden war. Durch allmählichen Zusatz von Glycerin zu den ausgewaschenen Schnitten blieben die Strahlungen unverändert und liessen sich in Glyceringelatine einbetten. Nach einem solchen Präparat ist auch Fig. 13 *b* gezeichnet worden. Die zarten Strahlen sind eingehüllt in ein sehr engmaschiges Gerüstwerk, zu dem die nach der Anfangsstrahlung allgemein ausgefällten Kügelchen des Globulines sich vereinigt haben. Ueber weitere Fragen vergleiche man den Abschnitt über die Polymorphie der Eiweisskörper.

Strahlungen in Gemischen lassen sich leicht erzeugen, nur hat man die Componenten so zu wählen, dass die eine sehr leicht schöne Strahlen gibt, die andere schwerer. Letztere lagert sich dann in feinpunktirt plasmatischen Gerinnseln zwischen die Strahlen ein und darf, um sie nicht ganz zu verdecken, nicht zu concentrirt sein. Z. B. löse man 1-proc. Serumalbumin und 2,5 Deuteroalbumose in 0,2

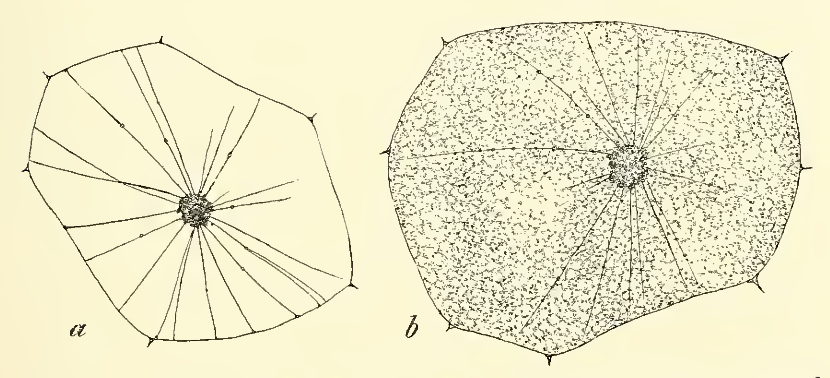


Fig. 12. Strahlungen und gröber maschige Gerüste, entstanden durch Fällung einer Mischung von 5-proc. Albumose und 2,5-proc. Hämoglobin, leicht sauer, durch 1-proc. Osmiumsäure in Hollundermarkschnitten. Diese waren nicht gleich reichlich in allen Zellen injicirt und daher entstanden theils reine Strahlungen um den Kernrest (*a*), theils wurden sie eingebettet in das maschige Gerüst, das sie theilweise verdeckt, theilweise aber ungetrübt bis an die Zellwand hervortreten lässt (*b*). Aus welchem Stoff hier die Strahlungen und Gerüste bestehen, ob aus den beiden Gemischcomponenten oder nur aus einer, ist nicht sicher zu sagen. Die Strahlungen sind hier sehr schön homogen-fädig, stellenweise knotig angeschwollen durch kleine Vacuolen, die infolge partieller Wiederlösung der Strahlensubstanz in dem Fixirungsmittel sich gebildet hatten. (Vergr. *a* und *b* 600.)

Kali und injicire in das Mark. In neutraler Osmiumsäure fällt natürlich nichts aus, beim Ansäuren mit Essigsäure erscheinen in 2—3 Minuten die schönsten Strahlungen aus Albumose, und zwischen ihnen lagern sich die Albumingerinnselchen ab. Sehr bald verwischt sich natürlich das Bild. Ob man durch Differenzirungsfärbungen die überdeckten Strahlungen herausheben kann, wurde nicht versucht. Selbst in diesem Beispiel ist es nicht ganz sicher, dass alle Strah-

lungen nur aus Albumose bestehen, es könnten auch einige aus Albumin sich dazwischengeschoben haben.

Noch schwieriger ist dies zu entscheiden bei den in Fig. 12 *a* und *b* (p. 217) abgebildeten Strahlungen, die aus einem Gemisch von 5 Proc. Albumose und 2,5 Proc. Hämoglobin durch Osmiumsäure abgeschieden worden sind. Die Strahlungen selbst sind homogen, sehen etwas anders aus als die aus reiner Albumose, so dass ich wohl glaube, dass beide Componenten des Gemisches sie zusammensetzen. (Vergl. auch die Figurenerklärung.) Das weitmaschige Gerüst der Fig. 12 *b*, in dem sich die Strahlungen tadellos bis zur Zellwand verfolgen lassen, ist ebenfalls wohl gemischt. So viel ist sicher, dass nicht etwa die Albumose allein die Strahlung, das Hämoglobin allein das Gerüst geliefert hat, aber ob die eine Bildung mehr von dem einen, die andere vielleicht mehr von dem anderen enthält, wage ich nicht zu bestimmen. Dazu müssten zahlreiche Versuche mit wechselnder relativer Concentration der Gemischcomponenten angestellt werden.

IV. Ursachen der Strahlung.

Die Bedingungen des Strahlungsphänomens sind theils durch die Beschaffenheit des Markes gegeben, theils müssen sie durch geeignete Auswahl der zu fällenden Eiweisslösung und des Fixirungsmittels geschaffen werden. Im Allgemeinen trägt das Mark dadurch zum Experiment bei, dass es mikroskopisch kleine, allseitig umgrenzte Räumchen darbietet, in denen sich Vorgänge, die in kleinen Zeitintervallen auf einander folgen, doch getrennt noch beobachten lassen. Der wesentliche Antheil des Markes aber an der Strahlung beruht auf dem Kernrest, der als heterogener, der chemischen oder physikalischen Fällung selbst nicht anheimfallender Fremdkörper genau so wirkt wie ein Staubtheilchen, das eine übersättigte Salzlösung zur Krystallisation treibt. Denn eine Uebersättigung geht jeder Fällung voraus, gleichviel ob sie chemisch oder physikalisch ist. Auch die Grösse des Kernrestes ist wichtig. Er muss eine gewisse Oberfläche haben, damit zahlreiche Ansatzpunkte für die Strahlen vorhanden sind. Sinkt der heterogene Körper unter eine gewisse, nicht näher bestimmte Grösse, so kann er, wie leicht begreiflich, nur einigen wenigen Strahlenanfängen zum Ansatz dienen und wird später, wenn die übrige Masse interradiär ausgefällt wird, nur noch als Knotenpunkt der gerüstigen Fällung erscheinen.

Ohne Bedeutung für das Phänomen erweist sich dagegen die Structur der Markzellwände. Denn wenn auch durch die Tüpfel die Fixirungsmittel etwas schneller eindringen, als durch die dickeren Wandfelder, so ist die Differenz doch sicher nur so gering, dass sie vernachlässigt werden kann. Wir wollen also annehmen, dass das Fixirungsmittel gleichmässig von jedem Punkt der Peripherie aus in die Markzelle eintritt und in die sie erfüllende Albumoselösung nach allen Seiten gleich schnell diffundirt. Jeder Punkt der Zellwand, gleichviel ob Tüpfel oder andere Stelle, wird also zum Mittelpunkt einer halbkuglig begrenzten Diffusionszone, die immer weiter gegen das Zellinnere sich vorschiebt. Auf jedem Radius einer solchen Kugelwelle herrschen, bei gleicher Entfernung von der Zellwand, die gleichen Concentrationsverhältnisse, solange nicht die Vermischung mit anderen solchen Bahnen stört. Betrachten wir aber weiterhin nur eine solche

Kugelwelle allein, so trifft sie schliesslich auf den Kernrest, gleichviel ob er in der Mitte oder sonstwo in der Zelle schwebt. Für jeden Punkt der Zellwand gibt es also einen Radius, auf dem das Fixirungsmittel vorströmend endlich den Kernrest treffen muss.

Proportional seiner Concentration und entsprechend seinem relativen Diffusionscoefficienten wird also nach einem gewissen, sehr kleinen Zeitraum das Fixirungsmittel in starker Verdünnung den Kernrest erreichen. Diese erste Verdünnung ist noch zu gering, um eine chemische Fällung hervorzurufen. Immer neue Mengen des Fixirungsmittels diffundiren herbei, und endlich ist auch in unmittelbarer Berührung mit dem Kernrest die Fällungsconcentration erreicht. Diese tritt natürlich zuerst an der Zellwand ein und schreitet auf dem Radius centripetal oder treffender „kernwärts" vor. Sobald die Fällungsconcentration am Kernrest erreicht, also die der Fällung vorangehende Uebersättigung eingetreten ist, wirkt nun der Kernrest als heterogener Körper, und die Ausfällung beginnt. Sie läuft nun, da nach der Wand zu auf dem ganzen Radius bereits die Uebersättigung vorher eingetreten war und es nur eines äusseren Anstosses zur Fällung bedurfte, in kurzer Zeit zur Zellwand zurück. Die Strahlen wachsen in der That auch vom Kernrest gegen die Peripherie (Fig. 9, p. 210), nicht umgekehrt.

Damit nun aber unsere Schilderung zutreffe, bedarf es noch einer besonderen Beziehung zwischen der Eiweisslösung und dem Fixirungsmittel. Gleichgiltig ist der mehr oder weniger colloidale Charakter der Eiweisslösung, da er die Diffusionsgeschwindigkeit des Fixirungsmittels nicht beeinflusst. Auch die Concentration der beiden Componenten hat wenig zu sagen, vorausgesetzt, dass nicht ein zu grosses Missverhältniss zwischen beiden herrscht und das Fixirungsmittel der Concentration der Eiweisslösung nicht mehr gewachsen ist und umgekehrt.

Den Ausschlag gibt das Verhältniss zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit des Fixirungsmittels und der Reactionsgeschwindigkeit desjenigen chemischen Vorganges, der zur Fällung, d. h. zur Bildung einer in der vorhandenen Flüssigkeit unlöslichen Verbindung zwischen Eiweisskörper und Fixirungsmittel führt. Stets muss die Reactionsgeschwindigkeit so klein sein, dass das Fixirungsmittel bereits am Kernrest in fällungskräftiger Concentration angelangt ist, bevor die Reaction zu Ende geht. Desshalb sind Albumine und Globuline etc. nicht so geeignet, mit Fixirungsmitteln in Hollundermark zu strahlen, weil (p. 215) die Reactionsgeschwindigkeit zwischen beiden zu gross ist. Die Fällung erscheint sofort an der Zellwand, wo zuerst die Fällungsconcentration erreicht ist, und schreitet nun kernwärts vor. Es bedarf unter diesen Verhältnissen gar nicht eines besonderen Weckers der Fällung.

Aus demselben Grunde gelingt es auch nicht, Strahlen aus Ferrocyankupfer in Mark einzulagern. Zahlreiche Versuche mit den verschiedensten absoluten und relativen Concentrationen von Ferrocyankalium und Kupfersulfat, von denen bald das eine, bald das andere in das Mark imprägnirt wurde, gaben keine einzige Strahlung, sondern immer nur gleichmässige, feinflockige Niederschläge. Immer erschienen diese sofort an der Grenzschicht der beiden Lösungen, deren chemischer Umsatz in unmessbar kurzer Zeit sich vollendet. Ist aber die Reactionsgeschwindigkeit gering, wie zwischen Albumose und Osmiumsäure,

so eilt das Fixirungsmittel zunächst ohne jede sichtbare Trübung bis an den Kernrest heran und erreicht hier die Fällungsconcentration, bevor die chemische Wirkung an der Zellwand einsetzte. Ist die Differenz zwischen Reactionsgeschwindigkeit und Diffusion recht gross, wie bei Albumose und Osmiumsäure, so lässt sich das ganze Strahlungsphänomen unter dem Mikroskop beobachten (p. 209); ist sie geringer, wie gegenüber Sublimat, Platinchlorid etc., so sind die Strahlungen schon fertig, wenn man auch noch so schnell das Präparat einstellt. Und selbst wenn man den imprägnirten Markschnitt erst allein einstellt und nun erst das Fixirungsmittel am Rande zufliessen lässt, so schiessen doch die Strahlen so schnell an, dass das Auge nicht zu folgen vermag. Der Strahl spannt sich schon durch die ganze Zelle aus, bevor es möglich war, seinen Keim am Kernrest zu entdecken. Hier werden die Zeitintervalle, in denen die Erscheinungen hinter einander herjagen, so winzig, dass die Beobachtung versagt. Nur aus dem langsamen Verlauf bei anderen Versuchen lässt sich, allerdings mit unbedingter Sicherheit, erschliessen, dass auch hier die Strahlung am Kern beginnt und blitzartig bis an die Zellwand heranstürmt. Einfacher wird der Vorgang, wenn die Fällung eine rein physikalische ist und nicht erst durch eine chemische Umsetzung eingeleitet werden muss. Als Beispiele sind zu nennen die Albumosefällung durch Alkohol (p. 212), die Verdünnungs- und Neutralisirungsstrahlung der Albumine und Globuline (p. 216). Hier entscheidet die relative Unlöslichkeit der betreffenden Eiweisskörper bei einem gewissen Alkoholgehalt (Albumose) oder bei gewisser Verdünnung resp. Neutralisirung des sauren oder alkalischen Lösungsmittels (Albumine, Globuline).

Albumose sei in einem Wasser mit 15 Proc. Alkohol noch gut löslich, bei 60 Proc. Alkohol falle sie schnell aus. Es bleiben also noch viele Zwischenconcentrationen des Alkoholes übrig, die schon fällen, aber nur langsam, wesshalb die Uebersättigung langsamer zur Fällung treibt als bei stärkerem Alkoholgehalt. Aehnliche Beziehungen bestehen auch zwischen der Globulinlösung und der Verdünnung mit Wasser. Es bedarf in allen solchen Concentrationen, die weniger Neigung zur explosionsartigen Ausfällung haben, eines äusseren Anstosses dazu. Desshalb erscheint der Niederschlag nicht sogleich an der Zellwand, sondern erst wenn der mechanische Anstoss der Berührung mit dem Kernrest, dem Strahlenwecker, wirkt, und daher entstehen hier die Strahlungen. Um sie zu ermöglichen, wird man in allen diesen Fällen das Fällungsmittel, den Alkohol, die Säure oder das Alkali, möglichst zu verdünnen haben, was auch aus den Versuchen auf p. 216 sich ergibt.

Da die Kugelwellen der diffundirenden Lösungen nicht alle zu derselben Zeit den Kernrest treffen, so können auch die Strahlen nicht alle gleichzeitig sich ansetzen, sondern sie müssen nach einander entstehen, wie die Beobachtung (p. 210) auch gezeigt hat. Wenn der Versuch schon einige Zeit läuft, dann müssen sich die verschiedenen Diffusionsbahnen vielfach kreuzen und durchsetzen, die stärkere wird die schwächere ablenken, bis ein unvorstellbarer Zustand resultirt, der wohl nur einer mathematisch-physikalischen Behandlung unter vereinfachten Annahmen zugänglich sein würde. Es müssen nunmehr auch secundäre Strahlen an die Hauptstrahlen sich ansetzen, und so müssten schliesslich, wenn neues Fixirungsmittel immer wieder zu-

flösse, gerüstähnliche Systeme entstehen. Desshalb wird man in Markstücken, die man auf 20 Stunden in einen Ueberschuss von Osmiumsäure eingelegt hat, zahlreiche solche Anastomosen zwischen den Strahlen finden.

Eine besondere Besprechung verlangen noch die Zellen mit zwei oder sehr selten drei Kernresten, zwischen denen unfehlbar das Abbild einer karyokinetischen Figur entsteht (Fig. 13, p. 222). Die nach der Peripherie laufenden Strahlen sind ja ohne weiteres den obigen Anschauungen einzuordnen. Die Verbindungsfäden zwischen den Kernresten wachsen sich natürlich nicht von beiden Kernresten entgegen und verschmelzen in der Mitte, sondern der eine Strahl setzt sich wahrscheinlich an den einen, ein anderer an den anderen Kernrest an und ergänzt sich bis zur Berührung mit dem gegenüberliegenden Rest. Wenn einmal in der Umgebung der Kernreste die Fällungsconcentration erreicht ist, so müssen eben nach allen Seiten die Strahlungen hervorbrechen, die einen laufen zur Zellwand, die anderen stossen schon nach kurzem Verlauf auf den nahe liegenden anderen Kernrest und erscheinen als Verbindungsfäden. Unsere Fig. 13 *a*—*d* lässt deutlich erkennen, dass von den Kernresten wirklich nach allen Seiten Strahlungen ausgehen und dass die zwischen den Kernresten sich ausspannenden nur ein Specialfall dieser allgemeinen Strahlung sind. Neue, besondere Kräfte oder Beziehungen kommen nicht ins Spiel. Nur erscheint es sonderbar, dass die peripheren Strahlen von den Zwischenkernstrahlen etwas abgelenkt sind, wodurch besonders die „Verbindungsfäden" sich freier abheben. Die Wandstrahlen verlaufen hier nur in anderen Ebenen, und daher kommt das abweichende Bild zu Stande, das sich leicht durch den anderen Theil der Figur, wo die Strahlung complet ist, corrigiren lässt. Wie stellt sich zu diesem Strahlenverlauf die histologische Strahlung, ist man berechtigt, hier mehr als äussere Aehnlichkeiten einzuräumen? Diesen Fragen mag der nächste Abschnitt sich zuwenden.

Zunächst soll hier noch ein anderes Princip der künstlichen Strahlenerzeugung, die Selbststrahlung, kurz erläutert werden. Auf einem Objectträger wird ein quadratischer Raum durch einen Vaselinwall umgrenzt und dahinein eine kurze, beiderseits offene Capillare so eingedrückt, dass die eine Mündung kurz in den Innenraum, die andere nach aussen vorragt. Nachdem die Durchtrittsstelle der Capillare durch das Vaselin noch hoch damit bedeckt worden ist, wird Albumoselösung in den Raum gebracht und ein Deckglas sanft aufgedrückt. Die Albumoselösung muss den Raum innerhalb des Vaselines ganz und ohne Luftblasen erfüllen und darf aus der Capillare nach aussen nicht hervorströmen. Diese Bedingungen zu erfüllen gelingt leicht. Man hat nunmehr nach kurzer Zeit eine ganz ruhige Lösung in der kleinen Kammer, die mit schwacher Vergrösserung so eingestellt wird, dass der in die Albumoselösung ragende Mund der Capillare gut zu sehen ist. Nunmehr setzt man an den freien Capillarrand einen Tropfen eines Fixirungsmittels, z. B. 0,2-proc. Pikrinsäure, 0,5-proc. $HgCl_2$, 1-proc. $PtCl_4$, 1-proc. Osmiumsäure, Flemming'sche Lösung. Mehr wurde nicht geprüft. Von dem Capillarenmunde diffundirt die fixirende Lösung kugelschalig in die Albumoselösung (Fig. 14 *a* p. 223 und erzeugt nun hier eine zunächst sehr sanfte Trübung, die bald stärker wird. Schliesslich entsteht ein mehr oder weniger deutliches, nach der Capillare convergirendes Strahlensystem, dessen Gleich-

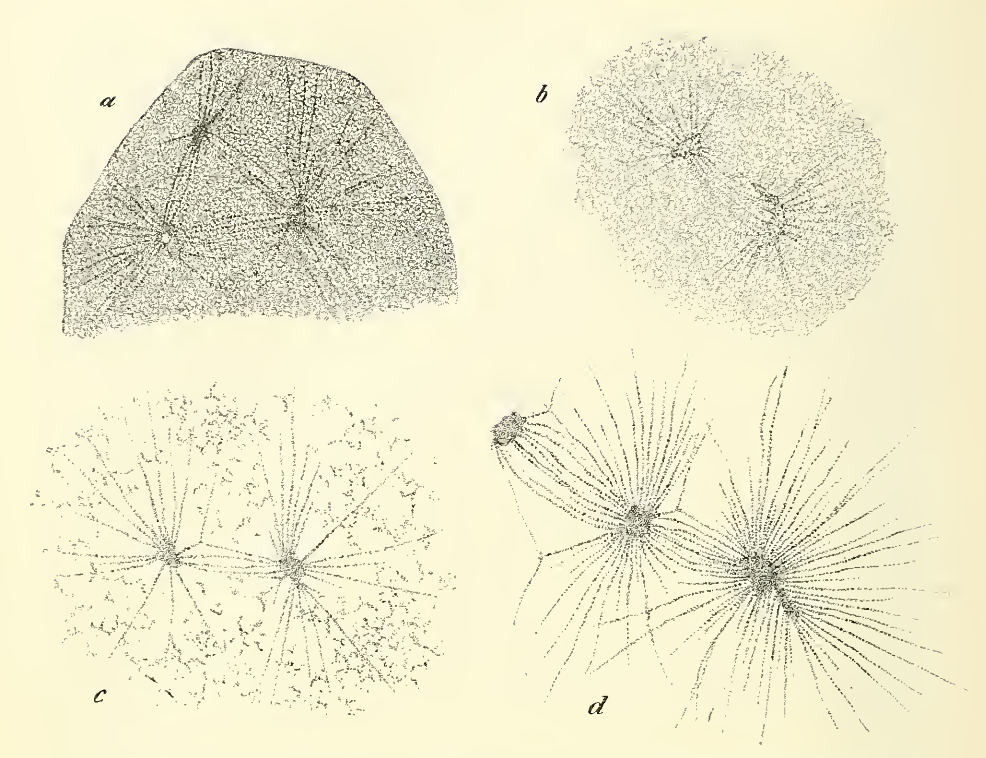


Fig. 13. Nachahmung karyokinetischer Figuren in Hollundermark. *a* 5-proc. Albumose in 5-proc. Gelatine; nach dem Erstarren der Gelatine wurden die Hollunderprismen in 1-proc. Osmiumsäure + 1-proc. Essigsäure eingelegt. Es waren drei kleine Inhaltsreste in der Markzelle, die als Ansatzpunkte für Strahlen aus Albumose gedient und das Ebenbild einer tripolaren Spindel hervorgerufen haben. Nachdem die Strahlen in der erstarrten Gelatine angeschossen waren, ist diese selbst engmaschig-gerüstig ausgefällt worden, ebenfalls von der Osminmsäure. (Vergr. 600.) *b* 2-proc. Globulin, in schwachem Alkali (0,5 KOH) gelöst, mit Essigsäure gefällt und wieder gelöst und nun nach p. 207 in Hollundermarkschnitte injicirt; durch 0,75 KOH ausgefällt und mit 1-proc. Platinchlorid secundär fixirt. Die Strahlungen um die beiden Inhaltsreste und die sie einbettende gerüstige Fällung des Globulines waren von Kali erzeugt und sind ohne jede Veränderung von Platinchlorid conservirt worden (Vergr. 600). *c* 2-proc. Serumalbumin (in 0,2 KOH) in Hollunderschnitten mit Flemming'scher Lösung gefällt; die Strahlen sind hier homogener als es durch die Autotypie wiedergegeben ist; die lockere, aus schlängelichen Aggregaten winziger Globulite aufgebaute, an einigen Stellen dichter gehäufte Ausfällung würde bei dichterer Zusammenlagerung ein schönes protoplasmatisches Gerüstwerk gebildet haben. Man beachte auch die Verzweigungsstelle der Strahlen, rechts vom linken Ballen; zwei ebensolche Strahlen auch in der folgenden Figur (Vergr. 1000). *d* 2,5-proc. Albumose, leicht sauer, mit 1-proc. Osmiumsäure gefällt in einer Zelle, in der drei Kernreste hinter einander lagen. Dementsprechend sind auch die Strahlen angeordnet, die sich auch schön durchkreuzen; etwa 1 Stde. nach dem Einlegen eines imprägnirten Schnittes in Osmiumsäure auf den Objectträger. Die geringe Menge der Osmiumsäure hat nicht ausgereicht, um die zwischen den Strahlen noch vorhandene Albumoselösung ganz auszufällen, wesshalb die Strahlen, einige in der Figur weggelassene Körnchen abgerechnet, ganz frei liegen. (Vergr. 400.)

mässigkeit von der Beschaffenheit des Capillarenmundes abhängt. Ist dieser schön glatt und gerade, so sind die Strahlen alle gleich, ist er aber schief (Fig. 14), so strömt natürlich nach der Seite, an der die Glaswand höher aufragt, weniger Fixirungsmittel ein als nach der anderen, und desshalb sind nach dieser letzteren zu die Strahlen

reicher und kräftiger, ebenso wie schon der erste, noch nicht strahlige Niederschlag (Fig. 14 *c*). Der abgebildete Fall bezieht sich auf 3-proc. Albumose, schwach sauer, und 1-proc. Osmiumsäure. Letztere war an die äussere Capillarenmündung um 12 h. 30 gebracht worden, und schon nach 1½ Minuten erschien als leicht getrübte, kugelschalige Zone der erste noch schwache Niederschlag im Innern (Fig. 14 *a*). Nach 4 Minuten (Fig. 14 *b*) und 8 Minuten (Fig. 14 *c*) hatte sich die Osmiumsäure und mit ihr der Niederschlag weiter ausgebreitet, stärker nach der einen Seite wegen des schiefen Capillarenmundes. Strahlung begann 8—10 Minuten nach dem Anfang des Versuches und hatte nach 15 Minuten das in Fig. 14 *d* dargestellte Aussehen. Später, nach weiteren 5 Minuten, hatte sich das Bild wesentlich verändert (Fig. 14 *e*), von der Capillare zog nach der einen Seite eine dichtere, strangartige Ansammlung der ausgefällten Körnchen, und an sie setzte sich erst das eine, unterdessen noch vervollständigte Strahlensystem an.

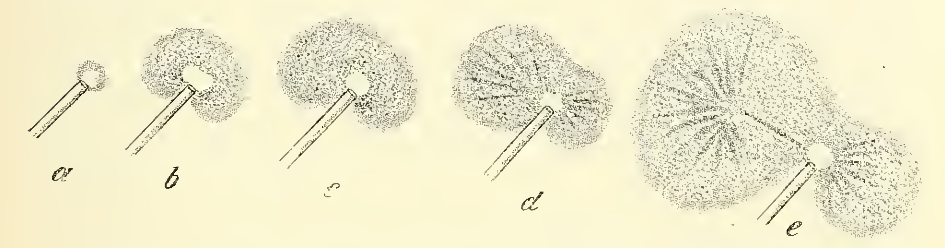


Fig. 14. Selbststrahlung von 3-proc. schwach saurer Albumose mit 1-proc. Osmiumsäure, die durch eine Capillare in die innerhalb eines Vaselinrahmens enthaltene und mit Deckglas bedeckte Albumoselösung eindringt (vergl. den nebenstehenden Text). *a* Anfangsstadium 12 h. 31½, *b* 12 h. 34, *c* 12 h. 38, *d* 12 h. 40, deutliche Strahlung! *e* 12 h. 45, etwas complicirte, durch den schiefen Capillarenmund, der in der Abbildung leider nicht angedeutet wurde, bedingte Strahlenfigur. (Vergr. 5.)

So schöne Strahlungsbilder, wie Osmiumsäure, liefern die hastigen Fixirungsmittel, wie Sublimat, Pikrinsäure etc. nicht, eine undeutlich strahlige Anordnung der gefällten Kügelchen und Partikelchen fehlt aber auch hier nicht. Aus denselben Gründen, wie im Hollundermark, versagt auch hier Serumalbumin mit den Fixirungsmitteln, die nur eine kugelig abgegrenzte Fällung in der Diffusionszone geben. Es kommt eben auch bei diesen neuen Strahlungsversuchen auf das Verhältniss zwischen Reactionsgeschwindigkeit und Diffusion an.

Die Strahlungen wachsen aber hier in umgekehrter Richtung von dem Capillarenmunde in das Innere der Albumoselösung, was ganz verständlich ist, da in dieser ein heterogener Körper, wie der Kernrest des Markes, fehlt, und daher die erste Fällung in der Nähe des Capillarenmundes sich niederschlägt, sobald die Uebersättigung erreicht und durch neue hinzuströmende Osmiumsäure der Anstoss zur Fällung gegeben worden ist. Die zunächst strahlenlose erste Anhäufung (Fig. 14 *b* u. *c*) trägt den Keim der Strahlung schon in sich, insofern als die ersten Körnchen, die ausfielen, bereits die Diffusionsradien bestimmen, auf denen sich weitere Körnchen ansetzen werden. Würde man mit starken Systemen die Erscheinung verfolgen können, so würde sicherlich diese Anfangsstrahlung auch zu sehen sein. Das ist aber wegen der gröberen Versuchsanstellung nicht möglich und dess-

halb werden hier die Strahlen erst sichtbar, wenn sie bereits durch weiteren Anschluss von Körnchen in tangentialer Richtung sich verbreitert haben. Die dünne Spitze der Strahlen, die bis an die Diffusionsgrenze heranreicht, kennzeichnet die Stelle, wo eben die Fällungsconcentration überschritten worden ist.

Man beachte noch folgenden Versuch. In den vaselinumgrenzten Raum mit der Albumoselösung tauche man ein sehr kleines Kryställchen von Sublimat unter und lege schnell ein Deckglas auf, wieder so, dass Luftblasen und Strömungen fehlen. Um das allmählich sich lösende Kryställchen bildet sich ein Diffusions- und Fällungsgürtel, der nach wenigen Minuten schon strahlig wird. Später, nach 10—20 Minuten, bildet der ungelöste Rest des Sublimates das Centrum einer Strahlenfigur, die infolge der gröberen Versuchsbedingungen freilich nicht so zierlich ausfällt, wie im Hollundermark. Um Kryställchen von Osmiumsäure, Kaliumbichromat, Pikrinsäure, in gleicher Weise in schwach saure Albumoselösung eingelegt, lagern sich die ausgefällten Partikeln nicht strahlig, sondern gleichmässig dicht an. Diese Abweichung erklärt sich sehr leicht aus den neuen Versuchsbedingungen. Aus der Capillare strömt doch eine verhältnissmässig dünne Lösung ein, die erst nach einiger Zeit bis zur Fällungsconcentration sich anreichert, während ein leicht löslicher Krystall schnell zu starker Concentration sich löst und sogleich eine gleichmässige Fällung erzeugt. Auch um die Sublimatkryställchen entsteht zunächst ein strahlenloser Hof. Dass an ihn sich später die Fällungen strahlig ansetzen, ist bedingt durch die grosse Fällungskraft des Sublimates, das, auch weit vom Krystall entfernt, in kurzer Zeit bereits bis zur Fällungsconcentration steigt. Daher wird die kleinste Unregelmässigkeit oder Hervorragung an der Peripherie des zuerst strahlenlosen Fällungshofes ein begünstigter Punkt der Ausscheidung und zum Ansatz eines Diffusionsradius, wenn dieser Ausdruck gestattet ist, auf dem die Fällung nun strahlig sich anordnet. Das neue Princip in diesem Versuche und in dem mit den Capillaren besteht darin, dass in eine Lösung ein Centrum eingetaucht wird, von dem aus das Fällungsmittel diffundirt. Hier bedarf es keines besonderen Strahlenweckers, sondern die ersten Fällungen, die entstehen, dienen selbst dazu. Und sie selbst bilden sich, weil sowohl um den Capillarenmund als auch um den sich lösenden Krystall herum die Concentration sehr schnell bis zur Höhe einer unausbleiblichen Fällung steigt.

Man könnte nach diesen Versuchen zwei Arten von Strahlungen unterscheiden: 1) die Strahlung um einen heterogenen Wecker, den Fremdkörper, wie im Hollundermark, und 2) die Strahlung um die Diffusionszone des Fällungsmittels, oder kürzer die Fremdstrahlung und die Selbststrahlung.

Kapitel II. Morphologie der histologischen Strahlung.

Um nicht blindlings Unvergleichbares zu vergleichen, wird es zunächst nöthig sein, einige allgemeine Eigenschaften der histologischen Strahlen zusammenzustellen und sie daraufhin zu prüfen, ob sie mit den künstlichen Strahlungen eine mehr als rein äusserliche Aehnlichkeit haben. Wir beschränken uns dabei auf die während der Mitose erscheinenden Strahlen: die Polstrahlen und die Spindelfasern und auf die Spermastrahlung bei der Befruchtung.

I. Entwicklung und Dauer der Strahlung.

Von einer Entwicklung der Strahlung könnte man nur dann sprechen, wenn sie wirklich in gewissen Zuständen des Zelllebens ganz verschwunden wäre und in anderen als besondere Neubildung wieder entstände. Schon hierüber stimmen die Zellforscher nicht überein, freilich hat sich nur eine kleine Zahl der Ansicht HEIDENHAIN's (I, viele Stellen; V, p. 343) angeschlossen, dass die „organischen Radien" ein elementarer Bestandtheil alles Protoplasmas seien und auch in der ruhenden Zelle stets sich ausbreiten, auch dann wenn sie mit unseren Hilfsmitteln nicht sichtbar zu machen sind. HEIDENHAIN selbst hat den Beweis für diese Behauptung noch nicht erbracht. Wie bedenklich lautet z. B. die Beschreibung der Strahlung in den Leucocyten; HEIDENHAIN (V, p. 296) gesteht selbst, dass die Fig. 2 *a—f* erst „bei einigem Herumsuchen" gefunden wurde und dass „einige Fibrillen vom Mikrocentrum aus bis zur homogenen Grenzschicht der Zelle" sich verfolgen liessen. Zumeist hat der Autor nur eine allgemeine radiäre Schraffirung gesehen, die keinesfalls zur Begründung seiner extremen Anschauung ausreicht. Wo nimmt HEIDENHAIN (V, p. 343) die Berechtigung her zu dem Satze, dass „die Bildung neuer Radien an sich mechanisch unverständlich ist und wir in allen den Fällen, wo es sich in der Zelle um wahre formationes de novo handelt, vor den denkbar grössten Räthseln stehen"? Doch nur aus seinem bereits p. 205 erwähnten Modell, das selbst auf unbegründbaren Voraussetzungen beruht.

Damit die Zellenlehre um ein weiteres Axiom von bekanntem Rhythmus bereichert werde, hat KOSTANECKI (I, p. 680) sein Vorbild HEIDENHAIN noch übertrumpft mit dem lapidaren: omnis radius e radio! Mit Freuden ist es zu begrüssen, dass die Mehrzahl der Cytologen sich nicht in ihrer nüchternen Auffassung erschüttern lässt und die Strahlungen als vorübergehende Structuren erklärt. FLEMMING (IX, p. 31) hatte bereits im Jahre 1882 die Strahlungen im Ei als „vorübergehende Structuren" gedeutet und hat auch später (XIII, p. 697) diese Ansicht beibehalten. Nach BOVERI (III, p. 35, 36) ist die Strahlungsfigur kein dauerndes Zellorgan und (III, p. 42): „die Anordnung zu strahligen Kugeln, die fädige Structur ist sicher nichts Dauerndes; sie geht für gewöhnlich nach der Theilung vollständig zu Grunde, um bei der Vorbereitung zur nächsten Theilung als etwas ganz Neues wieder zu entstehen". Ebenso haben sich in neuerer Zeit ausgesprochen und damit als Gegner der HEIDENHAIN'schen Construction bekannt: DRÜNER (II, p. 309), ZIEGLER (I, p. 77, II, p. 263), MEVES (I, p. 23), W. HIS (I, p. 428). Auch aus zahlreichen älteren Aeusserungen der Brüder HERTWIG wird man erkennen, dass sie die „Radienfigur" für eine vorübergehende Erscheinung halten. Nicht minder liegt diese Ansicht auch den neueren Ausführungen STRASBURGER's über das Kinoplasma zu Grunde, das (IV, p. 375) im unthätigen Zustande vom Trophoplasma nicht zu unterscheiden ist und immer erst in seiner typischen fädigen Structur erscheint, wenn es activ wird.

Die histologische Strahlung e n t w i c k e l t sich demnach zu gewissen Zeiten und vergeht wieder, wenn die sie hervorrufenden, uns unbekannten Zustände der Zelle von anderen abgelöst worden sind. Die rein morphologische Entwicklung dieser Strahlung überrascht durch ihre frappante Aehnlichkeit mit dem Wachsthum der künstlichen

Strahlungen. Auf die Beschreibung der Spermastrahlung, die HERTWIG gegeben hat, wurde schon p. 210 hingewiesen. Noch deutlicher sprechen die, allerdings nach fixirten Präparaten entworfenen Schilderungen der langsam sich ausbildenden Polstrahlung. So berichtet z. B. BOVERI (III, p. 47): „zuerst sieht man nur im nächsten Umkreis des noch einfachen oder schon getheilten Centrosoma verschwommene, unregelmässig strahlige Structuren, erst nach und nach greifen sie weiter hinaus und gehen unter allmählichen Uebergängen in die äusserst regelmässigen, aus scharf abgesetzten und isolirbaren Fäden zusammengesetzten Strahlenkugeln über.“ Nach HARPER (I, p. 251) wachsen die Strahlen vom Centralkörperchen aus durch das Cytoplasma. Ganz allgemein beschreibt O. HERTWIG (V, p. 146), dass die Polstrahlen erst kurz und auf die „allernächste Nähe der Attractionscentren“ beschränkt sind und während der Mitose immer länger werden, bis sie sich „endlich durch den ganzen Zellkörper“ erstrecken.

Ueber das Hervorsprossen der Spindelfasern lassen sich so gleich lautende und klare Angaben nicht zusammenstellen, weil die Ansichten über die Herkunft dieser Elemente zu weit auseinandergehen. Nach HERMANN (II) strahlen die Verbindungsfäden nach den Chromosomen von den Centrosomen aus, nachdem zwischen ihnen die sog. Centralspindel sich ausgespannt hat. Auch das von OSTERHOUT (I, p. 161, Taf. I, Fig. 6) geschilderte Eindringen von cytoplamatischen Polstrahlen in die stellenweise geöffnete Kernhöhlung, wo die Fäden an die Chromosomen sich ansetzen, spricht dafür, dass heterogene Körperchen bei der Strahlung eingreifen. Mehrere ebenso lautende Schilderungen enthält die Arbeit von MOTTIER (I).

Jedenfalls gilt auch für die strahligen Theile der zwischen den Polen liegenden Kerntheilungsfiguren, dass sie an heterogene Körper (Centrosomen — Chromosomen) ansetzen und von ihnen hinwegwachsend, sich verlängern. Man wird daher mit vollem Recht die Entwicklung der histologischen Strahlungen mit der künstlichen im Hollundermark sehr wohl vergleichen und eine principielle Uebereinstimmung feststellen dürfen.

II. Bau und Verlauf der Strahlen.

Der feinere Bau der Polstrahlen und Spindelfasern (der achromatischen Fäden) und der in Pflanzenzellen zwischen den Tochterkernen und der jungen Zellwand sich ausspannenden Verbindungsfäden ist aus den zahlreichen, allbekannten Abbildungen meistens nicht deutlich zu erkennen, weil diese mehr oder weniger schematisirt sind. Bald erscheinen hier die fädigen Bildungen als ganz homogen, ohne jede granuläre Beimischung, bald erweckt eine deutliche Punktirung den Anschein, als ob kleine Granula an einander gereiht wären. In Wirklichkeit kommt beides vor. So sind nach HERLA (I, p. 475) die achromatischen Fäden im Ascarisei bald homogen, bald punktirt. OSTERHOUT (I, p. 161, 162) schildert sie als Fäden mit Körnchen, und an einem pathologischen Object, an Carcinommitosen beschreiben sie LUSTIG und GALEOTTI (I, p. 240) als homogene, feine Fibrillen. Nach VAN BENEDEN und NEYT (I, p. 266) bestehen die Strahlen aus Mikrosomen „rénuis entre eux par des interfils“, HEIDENHAIN's organische Radien (I, p. 501) sind aus Mikrosomen aufgebaut, und auch O. und

R. Hertwig (I, p. 57) sprechen von Körnchen, die in radiären Reihen gruppirt sind. Selbst wenn es sich herausstellen sollte, dass die im Cytoplasma verlaufenden Polstrahlen mehr feinpunktirt granulär, die Spindelfasern vorherrschend homogen gebaut sind, so würde hieraus kein Einwand gegen den Vergleich mit den künstlichen Strahlungen zu erheben sein. Man betrachte die zarten Strahlen in Fig. 9, 10, 12, 13, und man wird keinen Unterschied gegenüber vielen histologischen Strahlungen herauszufinden vermögen. Wünscht man ganz homogene Fäden zu sehen, so vergleiche man Fig. 12 (p. 217), die Strahlungen aus einem Gemisch von Hämoglobin und Albumose, gefällt mit 1-proc. Osmiumsäure, darstellt. Ausser solchen homogen aussehenden Fäden und solchen, die feine Körnchen auf einem homogenen Faden aufgereiht tragen, kann man in Hollundermark auch locker in radiären Reihen angeordnete Granula erzeugen, z. B. mit Platinchlorid in Albumose (Fig. 10). Es lassen sich also alle die Structurverhältnisse, die an histologischen Strahlungen beobachtet worden sind, bequem nachahmen und alle diese Nachahmungen wachsen auf dieselbe Art, am Kernrest beginnend, zur Peripherie. Das verdient besonders betont zu werden, als Beleg dafür, dass ein verschiedener Bau der Strahlen keineswegs eine verschiedene Entwicklung voraussetzt, sondern nebensächlichen Bedingungen zuzuschreiben ist. Unter diesen darf das Fixirungsmittel nicht vernachlässigt werden, wie die abgebildeten künstlichen Strahlungen derselben Albumoselösung mit Osmiumsäure, Pikrinsäure, Platinchlorid und Sublimat (Fig. 9 u. 10 p. 210 u. 213) schon erkennen lassen.

Die Uebereinstimmung, die im Bau der histologischen und der künstlichen Strahlungen zu erkennen ist, wird noch ergänzt durch einen vollkommen übereinstimmenden Verlauf. Man betrachte die Abbildungen, die Flemming (I, Taf. VII) von Echinodermeneiern zusammengestellt hat. Um die hellen Flecken, in die nach neuerer Auffassung die Attractionssphären einzutragen sind, strahlen nach allen Seiten gleichmässig die Körnchenreihen aus, so dass sich im Cytoplasma die Strahlen der beiden Centren kreuzen (vergl. auch W. His, I, p. 410, 430; Hermann, II, p. 576, Taf. XXXI, Fig. 7—10), genau wie die künstlichen Strahlen in unserer Fig. 13 p. 222. Sehr ausführlich hat neuerdings Kostanecki (I, p. 653, 667, Taf. XXIX u. XXX, Fig. 1—7, 20—36) solche Durchkreuzungen der von den beiden Centrosomen auslaufenden Strahlen geschildert. Zugleich hat er mehrfach besonders erwähnt, was ja für seine theorische Speculation nothwendig ist, dass die Strahlen bis an die Eiperipherie sich verfolgen lassen. Das ist auch nach vielen anderen Beobachtern oft möglich, in anderen Präparaten aber verschwinden die zarten Strahlungen in dem übrigen Cytoplasma. Kurze, unvollständige und lange, bis zur Zellperipherie verlaufende Strahlen, beide Sorten sind mit den künstlichen Bildern vergleichbar.

Auch der Faserverlauf innerhalb der Kernspindel entspricht den aus unseren Nachahmungen sich ergebenden Forderungen: laufen gewisse Strahlen von Pol zu Pol, ohne an Chromosomen sich anzusetzen (die sog. Centralspindel), so sind eben die beiden Polkörperchen die heterogenen Körper, an denen die Keime der Strahlen sich ausscheiden könnten. Für die zwischen den auseinanderrückenden Chromosomen sich hinziehenden Fäden (Verbindungsfäden) würden die Chromosomen als heterogene Ansatzssellen wirken, und für die Pol und Chromosomen verbindenden diese beiden. Immer sind die Ursprungsstellen der

strahligen Gebilde in der Zelle Fremdkörperchen, vergleichbar dem Kernrest im Hollundermark.

Auch Unregelmässigkeiten, wie die schon p. 202 besprochenen abgeirrten Chromosomen oder die von den Brüdern HERTWIG (I) in überfruchteten Eiern beobachteten zahlreichen Spermastrahlungen weichen von dieser Grundbedingung nicht ab. Denn nur diese escheint wieder erfüllt, wenn die Brüder HERTWIG (I, p. 16, Taf. I, Fig. 18) z. B. berichten, „dass die einzelnen Spermaamphiaster das Bestreben haben, sich mit ihren Centren unter einander oder mit dem Spindelcomplex, welcher aus dem überfruchteten Eikern stammt, in Verbindung zu setzen und so immer complicirter werdende Figur zu bilden". Wenn bei sehr starker Ueberfruchtung nicht selten mehrere getrennte Complexe von Spindeln entstehen (I, p. 20, Taf. I, Fig. 21 *a* u. *b*), so ist daraus nur zu schliessen, dass ein zu buntes Durcheinander von Wirkungen die Reinheit der Erscheinungen getrübt hat.

Dass die Spindelfasern wirklich an die Chromosomen sich anheften und nicht nur bis in ihre Nähe vordringen, wird allgemein zugestanden und ja gerade der Theorie der Mitose von allen denen zu Grunde gelegt, die den Spindelfasern Contractilität zuschreiben. Aus demselben Grunde gelten auch die Centrosomen, für andere die ganzen Attractionssphären als Insertionsmittelpunkte für sämmtliche Polstrahlen.

Man wird zugestehen, dass auch der Bau und der Verlauf der histologischen Strahlen so vollkommen mit unseren künstlichen übereinstimmt, dass diese letzteren sicher höher als eine nur rein äusserliche Nachahmung geschätzt werden dürfen. Einen ersten Versuch, die histologischen Strahlungen nach unseren Beobachtungen abzuleiten, bringt das V. Kapitel des nächsten Abschnittes p. 257.

II. Abschnitt. Centralkörperchen und Sphäre.

Der in den letzten Abschnitten angedeutete und vorbereitete Vergleich der histologischen Strahlung mit der künstlichen im Hollundermark wird, daran zweifle ich keinen Augenblick, auf grossen Widerstand stossen, besonders bei allen denen, die das Centralkörperchen als Centrum cytologischer Kräfte und als eines der wichtigsten Organe in der Zelle anzustaunen sich gewöhnt haben. Um meine Ansichten davor zu schützen, dass sie nicht ganz unbesehen bei Seite geschoben werden, muss ich es noch wagen, die Fundamente der augenblicklich herrschenden Lehre von den Centralkörperchen und Sphären, den Attractionscentren, nach den in diesem Buche entwickelten Anschauungen und den sie begründenden Versuchen einer kurzen Kritik zu unterwerfen. Bei der Umschau nach Bundesgenossen erkannte ich bald, wie einsam ich dastehe. Denn über CARNOY, der seine im Jahre 1885 (I, p. 350) schon ausgesprochene Ansicht neuerdings im Verein mit LEBRUN (CARNOY, II, p. 207 etc.) wiederholt hatte, ist das Strafgericht bereits hereingebrochen, wie man bei FLEMMING (XVIII, p. 242, XIX, p. 430) ergötzlich lesen kann. Auch BOLLES LEE (I, p. 248 etc.), der zu gleichen Anschauungen wie CARNOY gekommen war, hat bereits das Schicksal ereilt (vergl. FLEMMING, l. c.). Ich kann es mir daher sparen,

die von den Genannten vorgebrachten Einwände gegen die Centrosomenlehre hier zu wiederholen.

Gelegentlich erhobene Einsprüche oder Bedenken stelle ich hier nicht besonders zusammen, weil sie, ebenso wie die CARNOY's, mit dem, was ich vorzubringen habe, gar nicht zusammenhängen. Damit ich nicht gleich von vornherein missverstanden werde, erkläre ich hiermit, dass ich die Centrosomen und Strahlungen keineswegs als Fixirungsartefacte durchweg betrachte, sondern dass ich nur eine genauere Scheidung zwischen Natur und Kunst anzubahnen wünsche und dort, wo man unbestreitbare und wohl conservirte Natur vor sich hat, eine einfachere Erklärung des Bildes zu geben versuche, die auch ohne das neue Zellorgan „Centralkörperchen" auskommt. Gegen meine Auffassung würden also Einwände wie die, dass die Spermastrahlung schon im lebenden Ei zu sehen sei, dass man helle, die Sphären verrathende Flecken an den Spindelpolen ebenfalls am lebenden Material, ja z. B. beim Salpenepithel (BALLOWITZ, I, p. 155) auch während der Kernruhe in jeder Zelle bemerken könne, dass die Centralkörperchen stets an den Spindelpolen bei gewissen Objecten sich herausfärben lassen: alle solche Einwände würden nicht ausreichen. Denn alles, was sie mir entgegenhalten, gebe ich gern zu, nur behalte ich mir vor, die Methodik der Centralkörperforschung kritisch zu prüfen und meine eigene Deutung der herrschenden gegenüberzustellen.

Kapitel I. Methodik der Centralkörper-Forschung.

Die Lehre von den Centralkörpern fusst, abgesehen von einigen wenigen Beobachtungen am lebenden Material, ganz und gar auf der Untersuchung gefärbter Präparate. Es ist daher zunächst zu prüfen, ob die hierbei verwendeten Fixirungs- und Färbungsmethoden zu den daraus abgeleiteten Anschauungen berechtigen. Die beliebtesten Fixirungsmittel, FLEMMING's und HERMANN's Gemisch sowie Sublimatlösungen, gehören zu denjenigen, die alle Eiweisskörper fällen und besonders auch zu granulösen Niederschlägen neigen. Es könnte also für die Centralkörperchen, deren Grösse ja meist unter 1 μ Durchmesser angegeben wird, zunächst der eine Beweis verlangt werden, dass sie mit ebenso winzigen und gut färbbaren Fällungsgranulis nicht verwechselt werden können. Aber selbst wenn man von diesem Einwande keinen Gebrauch machen wollte, so müsste man doch darauf dringen, dass die Centralkörper durch unzweifelhafte Merkmale von anderen, ursprünglich schon vorhandenen Granulationen (Mikrosomen) leicht unterschieden werden können.

Da die Fixirung das nicht vermag, so bleibt, zunächst einmal von der Morphologie dieser winzigen Gebilde abgesehen, nur die Färbung übrig.

1) Die Eisenhämatoxylinfärbung. Unter verschiedenen Tinctionsmethoden hat sich allmählich die Eisenhämatoxylinfärbung, besonders nach vorausgehender Sublimatfixirung, das grösste Vertrauen erobert. Ja, einem ihrer Ausbilder, M. HEIDENHAIN, hat es nicht an Kühnheit gefehlt. Er stellt (I, p. 660) folgende Entfärbungsscala auf, es entfärben sich zuerst: Protoplasma, „Linin" und „Lanthanin", dann das Chromatin, dann die Nucleolen und zuletzt die Centrosomen. Er geht sogar so weit, alle Granula, die nach der Entfärbung der

Nucleolen noch schwarz sind, als Centrosomen zu erklären, unbekümmert um ihre Zahl. So erreichen in den Riesenzellen des Rückenmarks die Centrosomen in einem Falle die stattliche Zahl von 94, in einem anderen von 61, häufig sind es mehr als 100 (I, p. 569—576). Dass alle diese schwarzen Körner Centrosomen sind, erkennt HEIDENHAIN (I, p. 571) daran, dass sie sich mit BIONDI's Gemisch und mit Eisenhämatoxylin genau so färben, wie in den Leukocyten, ferner an ihrer Grösse, die durchschnittlich 0,4 μ beträgt, und an ihrer Lage.

Für HEIDENHAIN ist gewissermaassen die Eisenhämatoxylinfärbung eine Reagenz auf Centralkörperchen. Dem hat bereits BOVERI (III, p. 4) widersprochen, freilich hat er dennoch die Centrosomenschwärme in den Riesenzellen als solche anerkannt (III, p. 66). Die in den beiden letzten Jahren erschienenen Arbeiten lassen keinen Zweifel darüber bestehen, dass die meisten Autoren mit HEIDENHEIN die genannte Färbungsmethode als Reagenz auf Centralkörperchen gebrauchen, wofür ich noch Beispiele bringen werde. Dem liegt freilich die chemische Theorie der Färbung zu Grunde. Da nun aber nachgewiesen werden konnte, dass bei der Eisenhämatoxylinmethode Färbung und Entfärbung genau so rein mechanisch geregelt sind, wie bei jeder beliebigen anderen Differenzirungsfärbung (p. 117), so entbehrt HEIDENHAIN's Lehrsatz aller Voraussetzungen.

Da jeder Zellinhalt ein heterogenes Object ist (p. 193), so ist zunächst noch festzustellen, ob es unter den untersuchten Eiweisskörpern besondere Launen gegenüber der Eisenhämatoxylinfärbung gibt. Gar nicht färbt sich die Nucleinsäure (p. 117), alle anderen Eiweisskörper aber werden intensiv schwarz gefärbt. So werden z. B. die Albumosegranula, die durch FLEMMING's oder HERMANN's Gemisch oder durch Chromsäure oder Kaliumbichromat, ferner durch Formaldehyd (Taf., Fig. 29) oder durch Sublimat (Fig. 15) gefällt worden sind, durch die Eisenhämatoxylinmethode genau so nach der Grösse sortirt, wie durch ALTMANN's Säurefuchsinfärbung oder durch GRAM's Methode. Ja, das Eisenhämatoxylin ist überhaupt die leistungsfähigste aller dieser Differenzirungsfärbungen und gestattet noch viel kleinere Granula z. B. aus Gerinnseln herauszuheben, als die anderen. Erst recht scharf gibt sie daher die Spiegelfärbungen (Taf., Fig. 29), die in schönster Mannigfaltigkeit aus einer Sublimatfällung, deren Granula gewiss klein sind, sich zusammenlesen lassen (Fig. 15). Das Granulagemisch ist homogen (p. 193), d. h. alle Granula haben das gleiche primäre Adsorptionsvermögen für Eisenalaun-Hämatoxylin und färben sich zunächst alle intensiv schwarz. Die Differenzirung in der Beize (Eisenalaun) sortirt die Granula nur nach der Grösse, zuerst entfärben sich die kleinsten, dann die mittleren. Jetzt ist das Stadium der Vollfärbung der grösseren Granula erreicht, die bald paarweise genähert, bald etwas entfernt von einander liegen. Neben rein kugligen sieht man auch gestreckte, die als Zwillingsbildungen aufzufassen sind. Differenzirt man jetzt ein wenig weiter, so bleiben vielleicht noch ganz seltene Riesenkörner voll gefärbt, in allen anderen ist Spiegelfärbung ein-

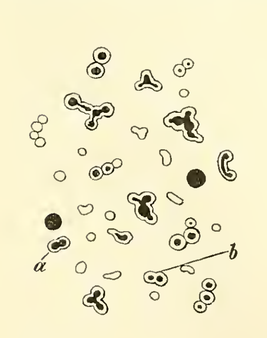


Fig. 15. 20-proc. Albumose, gefällt mit 7-proc $HgCl_2$; Eisenhämatoxylin. Figurenerklärung siehe p. 34.

getreten. Diese verschwindet bei weiterer Entfärbung in den kleineren von den grossen Körnern, und es bleiben jetzt nur die grössten mit schönen Spiegeln übrig, umgeben von einer farblosen Sphäre. Waren zwei solche Körner verklebt oder zwillingsartig verschmolzen, so umsäumt jetzt ein entfärbter Hof zwei nahe bei einander liegende winzige schwarze Körnchen (Fig. 2 *a* u. *b*), die gelegentlich auch noch durch eine zarte schwarze Brücke mit einander verbunden sind. Bald sind die Spiegel gleich gross, bald ist der eine um weniges grösser als der andere. Alle diese Dinge, die in den Beschreibungen der Centralkörper so oft wiederkehren, kann man sich hier in einem Präparat bequem zusammensuchen. Wenn man in der Sublimatfällung ein kleines Häufchen heraussucht, so wird man finden, dass von den zahlreichen Granulis zuletzt nur noch sehr wenige, vielleicht nur 1 oder 2 oder 3—4 mit schwarzem Spiegel hervortreten, alle anderen sind total entfärbt. Das kann ja auch nicht anders sein, einige wenige müssen die grössten und die zuletzt sich entfärbenden sein. Wenn also in einer Zelle, sei es ursprünglich, sei es durch die Fixirung erst gefällt, ein Gemenge granulöser Gebilde von gleichem primären Adsorptionsvermögen enthalten ist, dann müssen schliesslich bei der Hämatoxylinfärbung zuletzt einige wenige allein gefärbt sein. Sind die Granulationen alle nur sehr klein, so wird man die Differenzirung nicht bis zur Spiegelfärbung treiben können, die schwarz bleibenden sind also noch voll gefärbt; ist aber das Korn der Granulationen etwas grösser, vielleicht wie bei der Sublimatfällung, so bleiben zuletzt einige Spiegelfärbungen übrig, dem Centralkörperchen mit seinem hellen Hof entsprechend. Aber selbst wenn das primäre Adsorptionsvermögen der cytoplasmatischen Granulationen anderen Farben gegenüber ungleich wäre, so würde das gegenüber dem Eisenhämatoxylin nicht viel machen, weil das nicht so empfindlich wie etwa Methylgrün ist, sondern so universell wie möglich färbt. Was sich etwa gar nicht färbte, wie Nucleinsäuregranula, würde denjenigen, der Centrosomen sucht, ja überhaupt nicht interessiren; thatsächlich färben sich ja auch alle Zellgewebe intensiv mit Eisenhämatoxylin und lassen sich ganz in der Stufenfolge wie die Sublimatgranula entfärben. Es bleibt nun noch die Frage übrig, ob vielleicht die Substanz der als Centrosomen angesprochenen Körnchen ungewöhnlich dicht zusammengelagert wäre und so der Entfärbung, selbst bei geringem Durchmesser, länger widerstehen könnte als die übrigen Zellgranula, auch wenn sie viel grösser wären. Das ist sicher nicht der Fall, denn die Autoren sprechen, wie ich noch ausführlich zeigen werde, immer davon, dass noch andere schwarz gefärbte Körnchen in der Zelle zu sehen wären.

Besonders ist hier noch anzuführen, was M. Heidenhain (I, p. 663) über das Grössenverhältniss der Centralkörper zu den Zellmikrosomen sagt: „Nun ist gewiss, dass die ersteren, bei den Leucocyten wenigstens, durchschnittlich um ein Geringes grösser sind als die letzteren. Mithin könnte das Extractionsphänomen (d. h. das Schwarzbleiben der Centralkörper) lediglich durch den Grössenunterschied bedingt sein.“ Das verwirft aber Heidenhain, weil bei der sehr geringen absoluten Grösse aller dieser Gebilde die Grössendifferenz nur sehr minimal sein könnte, während doch die Centralkörper zuletzt, die nur wenig kleineren Mikrosomen zuerst sich entfärbten. Das fällt nicht ins Gewicht, denn ungleich grosse Granula

derselben Substanz entfärben sich doch nicht einfach proportional ihrem Durchmesser, sondern proportional dessen dritter Potenz. Wenn also ein Mikrosom etwa 0.3 μ Durchmesser, ein Centrosom 0,4 μ hätte, so verhielten sich ihre Entfärbungscoefficienten nicht wie 0.3 : 0.4 (1 : 1.33) sondern wie 1 : 2,35, das nur um $^1/_3$ Durchmesser grössere Centrosom würde sich also ca. $2^1/_2$ mal so langsam entfärben müssen. Das von HEIDENHAIN (I, p. 662) herangezogene Verhalten der sich rascher entfärbenden, sehr grossen Nucleolen ist für die Unterscheidung der Centralkörper von anderen Cytoplasmakörnern belanglos und könnte nur dort in Frage kommen, wo Centralkörper im Kern nachgewiesen werden sollen. Der andere Einwand, den HEIDENHAIN (I, p. 663) gegen die reine Grössendifferenzirung vorbereitet, dass Anilinblau die Zellgranulationen färbe, die Centralkörper aber nur schwach, lässt sich leicht dadurch widerlegen, dass in BIONDI's Gemisch die Centralkörper sich sehr kräftig mit Säurefuchsin färben, das nach HEIDENHAIN's eigener Angabe (I, p. 657) auch die Zellmikrosomen sehr intensiv färbt. Solche Widersprüche, in denen sich ja HEIDENHAIN sehr oft verwickelt, hätten ganz genau verfolgt werden müssen, um die Unterscheidung der Centralkörper von den Mikrosomen über allen Zweifel zu erheben. Auch muss ich unentschieden lassen, ob HEIDENHAIN's Centralkörper nicht vielfach reine Spiegeldifferenzirungen sind, die natürlich eine sehr lange Extraction der Farbe verlangen. Wir können also die Differenzirung einer Sublimatfällung der Albumose als vollkommenes Ebenbild der Differenzirung eines körnchenhaltigen Cytoplasmas auf Centralkörper betrachten und die Frage aufwerfen: woran ist das echte Centralkörperchen unter anderen, ebenfalls noch schwarz gefärbten Körnchen der Zelle zu erkennen? Für andere Färbungsmethoden gilt natürlich, da sie ebenfalls rein mechanisch sind, dieselbe Frage.

2) Morphologische Merkmale der Centralkörper. Man hat hier 2 Fälle zu unterscheiden, die ruhende Zelle und die mitotische. In der letzteren entscheidet einfach, wie bekannt, die Lage an den Spindelpolen. Andere gefärbte Körnchen, die sonst in der Zelle liegen, aber nicht an den Polen zu Centren von Strahlungsfiguren geworden sind, haben kein Anrecht auf die Einschätzung als Centralkörperchen. Viel heikler wird deren Erkennung in der ruhenden Zelle. Man höre z. B. folgende Aussprüche: „In meinen Präparaten traf ich an den Stellen, wo die im Protoplasma vorkommenden rothen Körperchen durch ihre Lage und durch ihr Verhältniss zu den Schleifen als Centrosomen charakterisirt waren, diese letzteren immer zu 2 Paaren an. Leider war ich für eine Unterscheidung der Polkörper von den anderen ebenfalls roth gefärbten Körpern in den ruhenden Zellen auf die Fälle angewiesen, bei denen eben die erwähnte Lage eine Charakterisirung gab. Am sichersten war dies natürlich für die späteren Stadien mit entwickelter oder wenigstens halb entwickelter Spindel möglich“ (METZNER, I, p. 335). „Die Centralkörper sind in der Regel recht kleine Gebilde und es hält schwer, falls sie nicht auf das umgebende Plasma derart wirken, dass besondere Structuren um sie herum entstehen, ein Centrosoma von sonstigen Einschlüssen des Zellleibes oder Kernes zu unterscheiden“ (v. ERLANGER, I, p. 388). „. . . durch reichlich vorhandene, intensiv schwarz gefärbte Körnchen wird es — wenigstens in meinem Präparat — unmöglich, sie (d. h. die Centrosomen) zu bestimmen, wenn man wohl auch manchmal geneigt

wäre, ein günstig gelegenes Korn dafür anzusprechen“ (Boveri, III, p. 11). „Dass man bisweilen versucht sein kann, ein oder zwei kleine Körnchen für Centrosomen zu halten, ist leicht verständlich, doch würde ich es nicht wagen, ein Körnchen ohne Strahlung dafür zu erklären“ (Kostanecki, II, p. 470). Auch M. Heidenhain kann nicht umhin (IV, p. 192), hervorzuheben, dass eine grosse Anzahl granulärer Zellbestandtheile selbst bei starker Differenzirung noch schwarz bleibe, so dass wohl solche Zellsorten, in denen nach Heidenhain (IV, p. 193) „die gewöhnlichen Protoplasmamikrosomen“ entfärbt werden und „bei einer eventuellen Differenzialdiagnose nicht in Betracht kommen“, sicher recht selten sein müssen. Viel seltener, als es nach den Versicherungen vieler Untersucher erscheinen könnte. Ausser diesen, leicht noch zu vermehrenden Aussprüchen, aus denen schon die ganze Unsicherheit des Centralkörper-Nachweises hervorgeht, will ich noch genauer zwei der neuesten Arbeiten besprechen, die nach Flemming (XIX, p. 435, 441) die Kenntniss der Centralkörper und Sphären wesentlich gefördert haben.

Ballowitz (I) fand im Salpenepithel sehr grosse Sphären und in diesen auch nach seiner Zählung in 96 Proc. 2 Centralkörper, von denen „gewöhnlich“ (I, p. 156) der eine sich schneller entfärbte (Eisenhämatoxylin) als der andere, was ja sich leicht erklärt, da sie vorherrschend (I, p. 159, 160) ungleich gross waren. Einen hellen Hof, der sonst mit Vorliebe als Merkmal des Centralkörperchens genannt wird, hat Ballowitz „nie“ (I, p. 158) gesehen. Er hat also Vollfärbung vor sich gehabt. Im Cytoplasma sowohl, als auch in der Sphäre selbst blieben in manchen Präparaten auch „andere kleinere und grössere, kugelige, tropfenähnliche Körnchen intensiv geschwärzt“ (I, p. 156). Sie waren also auch voll gefärbt. Wie unterschied nun Ballowitz diese Körnchen von den Centralkörperchen, die nach p. 161 in 959 genauer gemessenen Zellen auch keineswegs immer nahe bei einander lagen, sondern in 491 Zellen eine mittlere (0,9—1,8 μ) Entfernung von einander hatten, und in 102 Zellen sogar über 1,8 μ? „Jedenfalls haben sie (d. h. die anderen schwarzen, nicht zu den Centrosomen gerechneten Körnchen) mit der Zellstructur nichts zu schaffen“ ! ! (Ballowitz, I, p. 156.) Das ist allerdings sehr bequem und wohl die beste Illustration dazu, wie Centralkörper gesucht werden. Da Ballowitz nie einen hellen Hof um sie sah, so frage ich mich vergeblich, wie ein schwarzes Körnchen unter anderen schwarzen Körnchen als Centrosom erkannt werden kann. Es bleibt nur der Instinct übrig. Aber es kommt noch besseres. „Die oberflächliche Lagerung des einen oder beider Centralkörper ist in diesen platten Epithelzellen durchaus die Regel. Ja, ich habe wiederholt an den Durchschnitten den ganz bestimmten Eindruck gewonnen, dass die Centralkörper dabei zum Theil aus der Sphärensubstanz heraustreten können und an der freien Oberfläche der Zelle ganz nackt liegen“ (I, p. 163). Sie, diese wichtigen Organe der Zelle n a c k t an der Oberfläche, von dem Cloakenwasser unmittelbar umspült! Etwas weniger Centrosomen, aber etwas mehr Protoplasmatheorie wäre wohl zu wünschen gewesen. Was soll man nach diesen Proben von der schon am lebenden Material sichtbaren Sphäre halten? Sie ist nur an den ausgewachsenen Thieren deutlich, nicht an den Embryonen und ganz jungen Salpen (I, p. 189). Könnte vielleicht eine Vacuole mit fällbarem Inhalte vorgelegen haben? Solche Fragen müssten doch

auch berücksichtigt werden. Leider geschieht das nicht. Jedenfalls kann ich die Arbeit von BALLOWITZ nicht zu denen rechnen, durch die mein Vertrauen zu den Centralkörpern gewachsen ist.

Sehr verführerisch sehen auf den ersten Blick die Abbildungen aus, die K. W. ZIMMERMANN (I) neuerdings veröffentlicht hat, um die weite Verbreitung der Centralkörper in solchen ruhenden Zellen, wo man sie bis jetzt noch nicht gefunden hatte, nachzuweisen. Etwas stutzig wird man aber schon durch folgenden Satz ZIMMERMANN's (I, p. 563): „Unangenehm ist ferner für das Aufsuchen der Centralkörper, dass sich oft zahlreiche feinste schwarze Körnchen im Zellleib der Drüsenepithelien und zwar hauptsächlich in den Knotenpunkten des Protoplasmagerüstes färben, ganz abgesehen von den Secretmassen, welche besonders in den oberflächlichen Schichten der mit Sublimat fixirten Stücke als blauschwarze, mehr oder weniger dicke Körner auftreten und das Auffinden der Centralkörper ganz unmöglich machen." Dann heisst es weiter: „Von besonderem Nutzen war mir ein nicht zu starkes Nachfärben mit Säurefuchsin, weil dadurch bei manchen Epithelien (z. B. in der Hypoglossis) eine Attractionssphäre oder doch eine mehr oder weniger deutlich abgegrenzte Verdichtung des Protoplasmas um die Centralkörper herum zum Vorschein kam, wodurch sich die letzteren sofort von anderen Körnchen, welche gleiche Grösse besassen, unterscheiden liessen." ZIMMERMANN hat also, wie Andere auch, oft grosse Schwierigkeiten gehabt, die echten und rechten Centralkörper, die er meist paarweise (Diplosomen) einzeichnet, zwischen anderen Körnchen herauszufinden. Seine Abbildungen geben von dem Aussehen der Präparate keine rechte Vorstellung, denn hier sind die anderen Körnchen einfach weggelassen. Man betrachte z. B. Fig. 58—60, Taf. XXVIII, die tadellose Diplosomen in dem Fundusepithel des Menschen zeigen. Die Figurenerklärung sagt: Fig. 58 „Schleimzellen mit Mikrocentren", Fig. 59—60 „Schleimzellen, zum Theil mit Diplosomen". Im Text aber sagt ZIMMERMANN (I, p. 632): „Die Centralkörper glaube ich hier in der Mitte der Zelle zu sehen, in einer kleinen, nur wenig dichteren Protoplasmaanhäufung; es ist aber sehr schwer und in den meisten Fällen unmöglich, dieselben bestimmt zu recognosciren, da hier und da in dem Gerüstwerk noch andere minimale, schwarze Körnchen vorkommen, die aber augenscheinlich nichts mit Centralkörpern zu thun haben." Das ist wiederum sehr bequem; nur hätten diese Körnchen mit abgebildet werden müssen, damit der Leser auch sehen kann, ob die Auswahl, die ZIMMERMANN getroffen hat, auch wohlbegründet ist; ob die als Centralkörperchen „recognoscirten" Körnchen von den anderen auch wirklich sich so unterscheiden, dass sie bei eingehender Betrachtung als etwas Besonderes sich abheben.

Die sonderbare Lage der Centralkörper in den Epithelzellen, nahe dem Cuticularsaum, also in dem dem Kern entgegengesetzten Ende der Zelle, in deren Mitte der schwarze Kern und das schwarze Centralkörperchen zur „Prosynode" sich zusammenfinden sollen, verlangt noch eine besondere Bemerkung. Wenn man die Objecte in das Fixirungsmittel (Sublimat) bringt, so dringt dieses natürlich zuerst in die Epithelien der Darm- und Magenwand ein und erreicht unter dem Cuticularsaum seine grösste Concentration; ebenso dringt es sicherlich am schnellsten in die Ausführgänge der Drüsen vor und tritt wiederum zuerst in vollste Thätigkeit in den oberen Theilen der

Epithelzellen. Wenn also hier fällbare Substanzen gelöst sind, so werden sie hier am kräftigsten gefällt, die etwa entstehenden Granula werden hier grösser als in tieferen Theilen der Zelle, in der Nähe des Kernes. Fehlen solche gelöste Substanzen, sind die Plasmakörner schon lebend sehr concentrirte Vacuolen oder auch festere Gebilde, so werden diese dennoch bei der Fixirung mit dem Sublimat sich verbinden müssen und besonders dicht ausfixirt werden. Auf jeden Fall würde Gelegenheit gegeben sein, dass die Granulationen in der Nähe der Zelloberfläche der Entfärbung am längsten widerstehen, so dass schliesslich hier allein noch einige wenige Körnchen gefärbt übrig blieben, während das ganze übrige Cytoplasma sich entfärbt hätte. Diese zuletzt gefärbt bleibenden Körnchen als Centrosomen nur desshalb zu betrachten, weil sie nahe beisammen liegen, was auch nach ZIMMERMANN gar nicht immer geschieht, und noch schwarz sind, dazu berechtigt die ganze Färbungsmethode nicht. Die Sehnsucht, Centralkörper zu finden, kann sich an solche Entfärbungsbilder anklammern, aber ohne Grund. Denn die Methode berechtigt auch nicht dazu, schwarze Körnchen, die in einer sich theilenden Epithelzelle an den Polen der Spindel liegen, mit jenen schwarzen Körnchen gleichzusetzen, die in der ruhenden Zelle dicht unter dem Saum zu sehen sind.

Es ist noch zu ergänzen, was verschiedene Autoren über die Structur der Centralkörper gesagt haben, um zu sehen, ob vielleicht hieraus ein sicheres Merkmal gegenüber anderen Körnchen sich ableiten lässt. Nach HEIDENHAIN's neuerer Fassung (VI, p. 246) sind die Centralkörper „drehrunde, kleine Kugeln, die über die ganz bestimmte Grösse von 0,5 μ der Regel nach nicht hinauswachsen". FLEMMING (XX, p. 702) fand in den fixen Gewebszellen des Salamanders einen Durchmesser von höchstens 0,5 μ, in den Leucocyten bis 1,5 μ. Die Gestalt der Centralkörper ist nach FLEMMING (XX, p. 707) nicht immer rund, in den Leucocyten sind sie oft auch etwas länglich. BALLOWITZ (I, p. 159) fand in der Sphäre des Salpenepithels die Centralkörper nicht immer genau kugelig, sondern oft mehr rundlich eckig, soweit ihre Kleinheit etwas darüber zu entscheiden gestattete. Alle diese Beschreibungen reichen nicht aus, um durch die Gestalt die Centralkörper von anderen Zellgranulationen zu unterscheiden oder von etwaigen Fällungsartefacten. Auch der helle Hof, der um den Centralkörper oft beschrieben und abgebildet wird, reicht dazu nicht aus, denn selbst abgesehen davon, ob etwaige optische Erscheinungen (Beugungsringe) immer ausgeschlossen worden sind, müssen Spiegeldifferenzirungen, die doch hier sicher vorliegen, an jedem beliebigen Körnchen bei genügender Entfärbung sich einstellen.

Wichtiger könnte zunächst die Zahl der Centralkörper sein. Nach FLEMMING's Vorgange (XX, p. 702) hat man sich daran gewöhnt, auch in der ruhenden Zelle zwei nahe bei einander liegende Centralkörper (Diplosoma) aufzusuchen. Freilich nimmt man es, wie schon p. 233 u. p. 234 citirt wurde, mit der Nähe oft nicht so genau. Von diesen Fällen absehend, bleiben doch reichlich viel übrig, wo wirklich zwei kleine Körperchen nahe bei einander liegen, als ob sie zusammen gehörten (Mikrocentren). HEIDENHAIN (I, p. 479) fand in 21 Proc. der Leucocyten neben dem Zwillingspaar noch ein drittes, meist matter gefärbtes (NB. weil kleineres) Körnchen, das Nebenkörperchen, das

er (I, p. 484) als ein kleinstes Centrosoma auffasst. Weder die typische, noch die „nicht ganz typische“ Zusammenordnung dieser drei Centralkörperchen zum „Mikrocentrum“ kann irgend einen Anhalt dafür gewähren, dass sie besondere Gebilde sind, denn wenn Zellgranulationen nahe bei einander liegen, müssten sie sich ebenso gruppiren. Auch granuläre Fällungen würden dieselbe Mannigfaltigkeit geben. Man vergleiche nur einmal HEIDENHAIN's (I, Taf. XXVI) Fig. 27 mit unserer Abbildung, Fig. 15 auf p. 230, die eine Sublimatfällung von 20-proc. Albumose darstellt. Die Uebereinstimmung wird wohl jedem zu denken geben.

Aus dieser Zusammenlagerung lässt sich auch nichts über die Vermehrungsart der Centralkörper schliessen. Nach HEIDENHAIN (I, p. 486—489) sollen sie durch Knospung sich vermehren und hierauf gerade ihre Gruppirung beruhen. Solche Knospungsbilder enthielt aber auch jede granuläre Fällung von Albumose (Fig. 4a p. 37, Fig. 15 p. 230) oder Hämoglobin oder Nucleinsäure (Fig. 5 p. 43); sie entstehen dadurch, dass bald früher, bald später die ersten Fällungsstadien (Globuliten) paarweise an einander hängen bleiben. Sind die verklebten Körnchen ungleich gross, so erwecken sie den Anschein einer Knospung, sind sie gleich gross, den einer Theilung. In der That haben andere Autoren solche Theilungsstadien der Centralkörper beschrieben, wo die beiden Schwestern noch durch eine Brücke verbunden waren (vergl. z. B. BOVERI, II, p. 163, Taf. II, Fig. 33, Taf. IV, Fig. 75). Wieder verweise ich auf die Sublimatalbumose (Fig. 15), wo bei guter Spiegeldifferenzirung manche eng verklebte Globulitenpaare ein ebensolches Bild gewähren. Das erklärt sich folgendermaassen. Die beiden Globuliten sind sehr bald, im Anfang des ganzen Fällungsvorganges mit einander verklebt und sind nun gemeinsam zu bisquitähnlichen Zwillingen weitergewachsen. Ich brauche wohl nicht weiter auszumalen, wie unausbleiblich dann solche Entfärbungsbilder gegeben sind, wie die beschriebenen (Fig. 15 *a*). Verkleben die Globuliten erst am Ende des Fällungsprocesses, so ist jeder für sich in voller Abrundung noch unterscheidbar, die beiden Spiegel sind ganz getrennt. Vielerlei Zwischenstufen schieben sich hier noch ein, so mannigfaltig wie HEIDENHAIN's (I, Taf. XXVI, Fig. 27) Abbildungen.

Es bleibt sonach als Kennzeichen der Centralkörper nur noch ihre Lage zum ruhenden Kern übrig. FLEMMING (XX, p. 702) äusserte sich in der ersten Zeit der Centralkörperforschung, dass „die Entfernung der Centralkörper vom Kerne verschieden gross sein kann; manchmal liegen sie in den sehr flachen Zellen des Bauchfelles, um mehr als den halben Durchmesser eines Kernes von dessen Rande bei Seite gerückt, meistens aber nahe an ihm“. Das ist die Grundstimmung auch für spätere Untersucher geworden, bis man (ZIMMERMANN, K. W., I) den Kern in das eine, die Centralkörperchen in das andere Ende der schmal-cylindrischen Epithelzellen aus einander gerückt fand. Man kann wohl jetzt ruhig behaupten, dass jede Lage gegenüber dem Kern für zulässig gehalten wird. Also auch hierin liegt schliesslich kein Unterscheidungsmerkmal von anderen Zellmikrosomen, die etwa den ruhenden Kern umgeben.

Andere morphologische Merkmale, wie die Sphäre oder die von KOSTANECKI (II, p. 470) verlangte Strahlung werden nicht von allen Autoren gleichmässig gewürdigt. So werden die meisten Centralkörper von K. W. ZIMMERMANN ohne Strahlung, nur mit hellem Hof,

abgebildet, ebenso geht von den Centralkörperchen, deren Schicksal bei der Spermatogenese MEVES (IV) und LENHOSSÉK (I) verfolgten, keine Strahlung aus. Nach beiden Autoren wandern sogar die Centralkörper aus der Sphäre aus und werden in diesem sphären- und strahlenlosen Zustande doch noch als solche anerkannt. Es bleibt eben trotz vielerlei Beschreibung als Hauptmerkmal die intensive Schwärzung mit Eisenhämatoxylin übrig, die auch MEVES (IV) nach einem Ausspruch auf p. 132 als eine „Reaction" auf Centralkörper abzuschätzen scheint. Weder diese Färbung, noch irgend eine beliebige andere ist aber der ganzen Grundlage nach dazu befähigt, mit Hilfe der eben besprochenen, schwankenden morphologischen Merkmale unter anderen gefärbten Körnchen zwei als Centralkörper unzweideutig herauszuheben. Nicht einmal, wenn alle anderen Mikrosomen und Granulationen total entfärbt wären, würde eine Voll- oder Spiegelfärbung von zwei letzten, nahe bei einander liegenden Körnchen sie als Centralkörper legitimiren können.

Wie verführerisch die grosse Leistungsfähigkeit der Eisenhämatoxylinmethode ist, mag man daraus erkennen, dass v. LENHOSSÉK (vergl. FLEMMING, XIX, p. 438) die Basalkörperchen an den Cilien der Flimmerzellen wegen ihrer Schwarzfärbung für Centralkörper erklärt; jede Cilie hat dann ihr besonderes „kinetisches Centrum". Der unbefangene Beobachter würde hier nur Folgendes sehen. Die Cilien schwellen an der Durchtrittsstelle durch den Zellsaum etwas an, ihre Substanz drängt sich hier zu dichteren Knötchen zusammen, die natürlich das Hämatoxylin viel stärker festhalten, als die zarten freien Theile der Cilien. Mehr kann man aus der Schwarzfärbung nicht schliessen, freilich ist das nicht so pikant und „hochinteressant", wie das „kinetische Centrum", aber wahr ist es doch ganz allein.

Höchst sonderbare Gebilde hat SWINGLE (I) als Centrosomen von Stypocaulon scoparius beschrieben, bei dem früher STRASBURGER (II, p. 54, Taf. III, Fig. 1—7) und auch HUMPHREY (I, p. 115, Taf. VI, Fig. 13, 14) Centralkörperchen dargestellt hatten, die in ihrem Bau und Aussehen ganz mit GUIGNARD's sphères directrices übereinstimmten. SWINGLE (I, p. 327) dagegen berichtet, dass die Centrosomen „niemals einfache, runde Körnchen, sondern stets mehr oder weniger längliche, gewöhnlich keulen-, garben- oder hantelförmige Gebilde" sind, die höchst sonderbarer Weise „während aller Stadien ihrer Existenz" immer mit der Kernwand (p. 339) verbunden sind. Das ist allerdings ganz neu für Centrosomen. SWINGLE (p. 333) hält diese sonderbaren Gebilde nicht für identisch mit den von STRASBURGER und HUMPREY beschriebenen und glaubt in ganz unwahrscheinlichen Färbungsanomalien die Ursache für die abweichenden Befunde suchen zu sollen. Da STRASBURGER (V, p. 370) die Angaben SWINGLE's sanctionirt und auch bei Fucus ebensolche sonderbare Gebilde als Centrosomen gedeutet hat, so wird es wohl nothwendig sein, noch einen Augenblick bei SWINGLE's Angaben, als den ausführlicheren, zu verweilen. Man betrachte zunächst SWINGLE's Fig. 7, Taf. XV, von der es in der Figurenerklärung heisst, dass der obere Pol ein „langgestrecktes, gekrümmtes, die Kernwand einstülpendes Centrosom" zeigt. Sieht man sich diese Einstülpung näher an, so würde man, unbefangen urtheilend, sagen, dass hier die papillenartig vorgewölbte Kernwand sich geöffnet hat und dass der vielleicht zurückgerollte Saum dieser Oeffnung sich schwerer entfärbt hatte, als

die übrige Kernwand und so als etwas Besonderes erschien. Auch die anderen Figuren (2, 9, 10, Taf. XV) rufen keinen anderen Eindruck hervor.

Es sollen ja auch nach SWINGLE (I, p. 316) die Kinoplasmastrahlen an diesen Stellen die Kernwand, die freilich geschlossen bleiben soll, durchsetzen und so zu Spindelfasern werden. Ich halte es für unberechtigt, die Kernwand an den Durchtrittsstellen solcher Kinoplasmabüschel, wie SWINGLE (I, Taf. XVI, Fig. 15, 18, 20) abbildet, als geschlossen zu bezeichnen. Auch hat früher STRASBURGER (II, p. 54, Taf. III, Fig. 5) deutlich geschildert, dass der Zellkern bei Stypocaulon auf solchen Stadien an seinen beiden Polen offen ist, „in unmittelbarem Anschluss an die Astrosphäre“. Ebenso verdünnt sich bei Fucus (STRASBURGER, V, p. 357) die Wandung an den Kernenden so, dass sie schliesslich fast unkenntlich wird. Eine sichere Entscheidung kann ja nur die Nachuntersuchung der Objecte bringen, aber es ist doch höchst wahrscheinlich, dass auch in SWINGLE's Präparat die Kernwand an den Polen sich geöffnet hatte und nun leicht der schon besprochene Färbungserfolg etwas Besonderes vortäuschen konnte, obgleich sich dieser nach der physikalischen Grundlage der Färbung ganz harmlos erklären lässt. Dass nur circumscripte Theile der Wand sich gefärbt hatten, möchte ich schon aus der Angabe SWINGLE:s (I, p. 330), die STRASBURGER (V, p. 370) auch für Fucus wiederholt, schliessen, dass die Centrosomen der Kernwand stets eng verbunden sind, oft wie ihr eingedrückt aussehen. Ich glaube, man wird mir darin beistimmen, dass die von SWINGLE beschriebenen absonderlichen Gebilde die allgemeine Discussion der Centralkörperfrage bis auf weiteres nicht zu beeinflussen vermögen.

Auch die vorläufige Mittheilung, die MOTTIER (III) über das Centrosom bei Dictyota gemacht hat, wird noch weiterer Ausführung bedürfen. Das Centrosom soll zwar dem bei Stypocaulon sehr ähnlich sehen, aber (III, p. 125) doch nicht immer unmittelbar der Kernmembran anliegen, auch sie nicht so einbuchten, wie SWINGLE beschreibt. Leider gibt MOTTIER darüber nichts an, ob die Kernwand an den Stellen, wo die Centrosomen lagen, geöffnet war.

3) Die Sphäre. Nach FLEMMING's (XIX, p. 428) neuestem Zellbericht ist die Frage, ob die Centralkörper stets eine Substanz bei sich haben, „welche die Sphäre repräsentirt“, auch im letzten Jahre noch nicht endgiltig beantwortet worden. Als allgemeines Kennzeichen eines Centralkörpers kann also die „Sphäre“ nicht gelten, schon desshalb nicht, weil vielerlei verschiedene Gebilde als Sphären bezeichnet werden. So hatte GUIGNARD in seinen noch zu besprechenden „sphères directrices“ sicherlich Spiegeldifferenzirungen gröberer Granula vor sich, die auch Anderen vorgelegen haben mögen (vergl. auch p. 241). Die Sphäre, die BALLOWITZ (I) beschrieben hat, ist dagegen ein ganz anderes Gebilde, über das ich mich schon (p. 233) geäussert habe. Ganz anderer Art scheint die Sphäre zu sein, die MEVES (V) aus dem Sesambeine des Frosches geschildert hat, denn sie war (V, p. 136) in den meisten älteren Knorpelzellen neben dem Kern allein noch übrig geblieben, das Cytoplasma war verschwunden. Merkwürdig stimmt damit die Angabe HEIDENHAIN's (VI, p. 229) überein, dass in degenerirenden Leucocyten Kern und Mikrocentrum mit Sphäre sich bis zu allerletzt erhalten, während das Protoplasma zerfallen und bereits vollständig geschwunden sein kann.

Selbst auf die Gefahr hin, ausgelacht zu werden, möchte ich mir im Anschluss an meine Beobachtungen über die Reifung des Hollundermarkes eine Bemerkung erlauben, die ich weniger als eine endgiltige Erklärung der Sphäre im Sesamknorpel und in Leucocyten aufgefasst wissen möchte, als vielmehr als einen Fingerzeig für Diejenigen, die die genannten Objecte oder ähnliche auf Sphären untersuchen. In den reifen, sonst ganz leeren Hollundermarkzellen schwebt ein zarter, wolkiger Ballen, der oft noch einige glänzende Körnchen enthält und als Kernrest zuletzt und unverwüstlich von dem ganzen, allmählich schwindenden Zellinhalt übrig bleibt (vergl. p. 208). Knorpelzellen sowohl wie Leucocyten neigen ausserordentlich zur Zwei- und Mehrkernigkeit. Es erhebt sich also die Frage, ob bei weiterem Fortbestehen zweikerniger Zellen die beiden Kerne neben einander sich erhalten oder ob vielleicht der eine Kern allmählich degenerirt, um so dem anderen wieder die Alleinherrschaft in der Zelle abzutreten. Stirbt, wenn auch sehr langsam, die ganze Zelle ab, so wäre weiter zu fragen, ob die Kerne, die ja nach obigen Angaben von Meves und Heidenhain sicher das Protoplasma überdauern, in gleichem Tempo allmählich schwinden oder ob der eine, der, falls die Zelle länger leben geblieben wäre, etwas schneller degenerirt wäre, auch jetzt noch dem anderen Kern vorauseilt. In diesem Falle wäre die Möglichkeit gegeben, dass neben einem noch wohl erhaltenen Kern ein stark verrotteter, dem Kernrest im Hollundermark gleichender übrig bliebe, der nun ganz und gar wie eine Sphäre aussähe. Sowohl in der Form und dem Körnchengehalt (Centralkörper), als auch in einer gewissen starken Färbbarkeit, denn da er aus gut färbbarer Kernsubstanz besteht, würde sich diese Eigenschaft auch an dem verfallenen Kern noch, wenn auch abgeschwächt, äussern. Würde der Verfall zunehmen, so könnte endlich ein Stadium eintreten, wo die Färbung des Kernrestes nur wenig noch die des Cytoplasmas überträfe, wohl aber noch ausreichte, um bei günstiger Differenzirung sich zu erhalten. Ich muss gestehen, dass die Abbildungen, die Meves giebt, mir gleich beim ersten Anblick eine solche Deutung nahe legten, die freilich erst ein entwickelungsgeschichtliches Studium bestätigen könnte. Man verstehe mich nicht falsch, ich will nicht die Beobachtungen Anderer kurzweg nach meiner Vermuthung umdeuten; ich will nur auf eine solche, keineswegs aus den Fingern gesogene Möglichkeit hinweisen. Die Kernähnlichkeit mancher solcher Sphären ist ja von den Autoren selbst schon hervorgehoben worden, ohne dass die Frage, ob vergehende, überzählige Kerne vorhanden sein könnten, aufgeworfen worden wäre. Es bleiben aber noch andere Sphären übrig: die in den Geschlechtszellen der Thiere. Besonders sind ja die ersten Furchungsstadien der Eier durch schöne Sphären ausgezeichnet. Was kann hier vorliegen und berechtigt die Beobachtung dazu, diese Sphären mit ihren Centralkörpern wirklich als Zellorgane aufzufassen? Da die Gründe hierfür, abgesehen von der Persistenz der Sphären während der Kernruhe, vorwiegend von den mitotischen Vorgängen abgeleitet werden, so verweise ich auf die folgenden Kapitel.

Kapitel II. Spiegelfärbungen an natürlichen Objecten.

Die an vielen Stellen dieser Arbeit, besonders p. 31 (Taf., Fig. 11—15, 26—30) besprochenen Spiegelfärbungen oder Spiegeldifferenzirungen der Albumosegranula sind auch am fixirten Objecte schon mehrfach beobachtet worden und haben auch, wie sich bald ergeben wird, manchen, der nach Centralkörpern suchte, irre geführt. Bevor ich auf die Hauptsache, die Spiegelfärbung der aus dem Kern ausgestossenen und im Cytoplasma allmählich verrottenden Nucleolen eingehe, will ich noch zwei andere Fälle kurz besprechen.

1) Spiegelfärbung an rothen Blutkörperchen. M. Heidenhain (I, p. 441, Taf. XXV, Fig. 19 a—g) fand nach Vorfärbung mit Bordeauxroth oder Anilinblau, dass das Eisenhämatoxylin aus den rothen Blutkörperchen nicht auf einmal total extrahirt wurde, sondern dass nicht selten im Innern „ein schwarz gefärbter, kreisrunder, scharf contourirter Körper, dessen Umfang immer ganz genau concentrisch zum Umfang des Blutscheibchens geordnet“ war, übrig blieb. Je nach der Entfärbung war ganz wie bei unseren Albumosegranulis der Spiegel bald breiter, bald schmäler, schliesslich auf ein winziges schwarzes Korn, genau in der Mitte der Blutscheibe, beschränkt (I, Taf. XXV, Fig. 19 f). Heidenhain möchte am liebsten (I, p. 442, Anmerk. 1) auch hier Centralkörper wittern, ganz kann er sich aber noch nicht entschliessen. Eine specifische Erscheinung nimmt er aber doch an, denn andere regressive Methoden, wie Safranin-Gentiana und ähnliche, sollen solche „Pseudokerne“ nicht veranschaulichen. Es tritt hier wieder die grössere Feinheit der Eisenhämatoxylinmethode hervor, die eine langsamere Entfärbung als die anderen Methoden gestattet und so, rein auf mechanischer Grundlage das ganze Bild, das Heidenhain nicht zu erklären vermag, hervorruft. Durch sehr gelinde Differenzirung würde es sicher auch mit den anderen Differenzirungsfärbungen gelingen, die Blutscheiben nur bis auf Spiegel zu entfärben. Wenn nicht vorgefärbt wurde, dann entstanden diese Spiegel nicht, die Blutscheiben waren entweder total entfärbt oder noch schwarz, aber mit „hell durchscheinender Mitte“. Aus Heidenhain's kurzem Bericht kann ich nicht deutlich erkennen, ob er diese Frage ausführlich verfolgt hat oder ob es ihm nur nebenbei so erschienen ist. Unrichtig ist jedenfalls, dass Heidenhain aus der biconcaven Gestalt der Blutscheiben schliesst, dass die dünnere Mitte sich eigentlich nicht langsamer als der dickere Rand entfärben dürfte. Denn die Substanz könnte ja gerade durch die Dellen nach der Mitte zu dichter zusammengedrängt sein.

2) Siderophile Körner nennt Bolles Lee (I, p. 244) sowohl im Cytoplasma als im Kern der Spermatocyten von Helix vorkommende Granulationen, weil sie sich intensiv mit Eisenhämatoxylin schwärzen und auch die Farbe lange halten. Bolles Lee unterscheidet nackte siderophile Körner, d. h. solche, die voll gefärbt sind, und corpuscules aréolés, d. h. nach meiner Auffassung solche, die bis zur Spiegelfärbung entfärbt sind, was auch aus den Abbildungen bei Lee deutlich sich erkennen lässt. Lee hat allerdings diese Spiegelfärbung nicht in ihrem wahren Wesen erkannt, denn er meint (I, p. 252), dass die im Kern entstehenden, zunächst nackten Körner später aus diesem ausgestossen werden und nun im Cytoplasma entweder nackt bleiben oder „s'entourent d'une aréole claire“. Das ist

sicherlich falsch, sie umgeben sich nicht mit einem farblosen Hof, sondern dieser entsteht einfach infolge der Entfärbung bis zum Spiegel. Da LEE die noch im Kern eingeschlossenen Körner niemals bis zur Spiegelfärbung entfärbte, so behauptet er (I, p. 251), dass die corpuscules sidérophiles du noyau stets nackt seien. Auch das ist unvollständig, wir werden bald sehen, dass auch in dem Kern eingeschlossene Nucleolen und auch Chromosomen bis zur Spiegelfärbung sich differenziren lassen. LEE leitet von kernbürtigen, siderophilen Körnern auch die Centralkörper ab und berührt damit eine Frage, die uns auch noch zu beschäftigen hat. Nur betrachtet LEE die siderophilen Körner nicht schlechthin als Nucleolen, sondern als eine besondere Sorte von Granulationen. Sicher sind es dieselben Bildungen, die während der Mitose schon von vielen Autoren im Cytoplasma gesehen worden sind. Alle diese im Kern entstandenen siderophilen Körner sind nach LEE (I, p. 252): „destinés à se dissoudre dans le cytoplasme sans y avoir joué une rôle mécanique quelconque. C'est bien à tort qu'on voudrait leur imposer la dénomination de centrosomes, car ils ne sont les centres obligés d'aucun organe ou système organique de la cellule". LEE ist, wie schon erwähnt, ein Gegner der Centrosomenlehre und hält die an den Spindelpolen sitzenden Körperchen nur für an dieser Stelle ausgestossene siderophile Körner. Unter denjenigen, die ins Cytoplasma gelangen, fand LEE (I, p. 248, Taf. II, Fig. 46) in ein und derselben Zelle unter intensiv sich färbenden auch solche, die sehr blass bleiben, kaum zu bemerken sind. Er vermuthet, dass diese im Begriff sind, sich im Protoplasma zu lösen. Wir werden sehen, dass alle diese Erscheinungen auch an Pollenmutterzellen sich bestätigen lassen und sicher ganz allgemein verbreitet sind.

3) Spiegelfärbung der Nucleolen und GUIGNARD's sphères directrices. Bei einer Nachuntersuchung der Pollenmutterzellen von Liliaceen (Lilium candidum, Hemerocallis fulva, Funkia ovata) fand ich im Cytoplasma Gebilde (Fig. 16 *d* u. *e*), die ihrem Aussehen und ihrer Grösse nach sicher den Attractionssphären entsprechen, die GUIGNARD (I) beschrieben hat. Die von mir beobachteten Gebilde, ein stark gefärbtes Körnchen, umgeben von einer farblosen Zone, gehören zweifellos zu den siderophilen Körnern von BOLLES LEE und verdanken ihr Aussehen einer bis zur Spiegelfärbung getriebenen Differenzirung. Diese ist am bequemsten mit Eisenhämatoxylin zu erreichen, aber auch die Safranin-Gentianamethode oder ALTMANN's Säurefuchsin-Pikrin geben bei glücklicher Differenzirung die schönsten Spiegelfärbungen. Auch die Fixirung ist bis zu gewissem Grade gleichgiltig, wenn man nur genügend lange differenzirt, um andere Granulationen, die besonders nach FLEMMING's und HERMANN's Lösung sehr farbkräftig geworden sind, zu entfärben. Sublimat mit nachfolgender Eisenhämatoxylinbehandlung würde ich den Nachuntersuchern als das Beste empfehlen können, weil das Sublimat andere Mikrosomen oder etwaige Fällungsgranula gegenüber den „Sphären" leicht ganz zu entfärben gestattet. Wo diese sphärenähnlichen Gebilde herstammen, ist aus der Literatur leicht zu erkennen. Auf die Zusammenstellung bei A. ZIMMERMANN (IV, p. 64) verweisend, will ich nur kurz wiederholen, dass die Nucleolen der Pflanzenzellen während der Mitose in das Cytoplasma ausgestossen werden, während ihr weiteres Schicksal hier noch unsicher ist. A. ZIMMERMANN (I, p. 31) folgert

aus seinen Beobachtungen, dass „die während der Karyokinese im Cytoplasma beobachteten zahlreichen Nucleolen später wieder in die Tochterkerne hereinwandern und dort zu den grossen Nucleolen derselben verschmelzen.“ Daher stellt ZIMMERMANN den üblichen Satz auf: Omnis nucleolus e nucleolo. Mit vollem Recht hat sich dieser Satz keines Beifalls erfreut. Verschiedene Forscher, wie STRASBURGER (III, p. 155—157), ROSEN (II, p. 263) haben überzeugend dargethan, dass die herausgeworfenen Nucleolen allmählich im Cytoplasma sich lösen und dass in den Tochterkernen die Nucleolen als Neubildungen entstehen. Wir können sicher damit rechnen, dass diese Ansicht den wahren Sachverhalt trifft und auf ihr weiterbauen. Ich beschränke mich in dieser Frage auf die botanische Literatur, weil in der anatomischen nur ein geringes Interesse für den Nucleolus in der letzten, centralkörperreichen Zeit hervorgetreten ist.

Vielleicht wird ein Anatom durch folgende Zeilen dazu veranlasst, auch einmal in schnell mehrmals sich theilenden thierischen Zellen (Spermatocyten etc.) auf die verrottenden Nucleolen zu achten (vergl. chromatoide Nebenkörperchen p. 247).

Sehr schwierig ist es, die Beziehungen zwischen diesen und etwaigen als Centralkörper beschriebenen Gebilden festzustellen. KARSTEN (I) hat ungefähr gleichzeitig mit A. ZIMMERMANN (I, p. 13) in den sporogenen Zellen von Psilotum triquetrum, deren ruhende Kerne mehrere (2—3) Nucleolen enthalten, beobachtet, dass diese während der Mitose in das Cytoplasma übergehen. KARSTEN (I, p. 559) konnte sich der Ansicht nicht verschliessen, dass diese herausgeworfenen Nucleolen, die an den Mitosen oft genau die polare Stellung der Centralkörper einnehmen, nichts anderes seien als GUIGNARD's sphères directrices. Nur gelang es KARSTEN nicht, den lichten Hof, der in GUIGNARD's Abbildungen immer schön hervortritt, deutlich hervorzuheben. Da KARSTEN mit einem Gemisch von Hämatoxylin-Eosin färbte und nicht besonders differenzirte, so konnte er freilich keine Spiegelfärbungen erhalten, was auch aus seinen Abbildungen hervorgeht. HUMPHREY (I, p. 115), der jedenfalls mit Jodgrün-Fuchsin färbte und allem Anschein nach mit jod- und essigsäurehaltigem Alkohol differenzirte, konnte dagegen sehr leicht Spiegelfärbungen derselben Gebilde erzielen, die KARSTEN nur vollgefärbt vor sich hatte. So ist es erklärlich, dass HUMPHREY (I, Taf. II, Fig. 6 u. 7) an Psilotum sehr schöne einfache und doppelte Centrosphären am Spindelpol fand, deren Beschreibung deutlich erkennen lässt, dass Spiegeldifferenzirung vorlag. HUMPHREY folgert aus dem Aussehen dieser Gebilde, die er auch noch an anderen Objecten, z. B. Ceratozamia, Osmunda fand, dass sie mit Nucleolensubstanz nichts zu schaffen haben und verwirft daraufhin auch KARSTEN's Ansicht.

Auch alle anderen Untersucher der herausgeworfenen Nucleolen haben diese nur vollgefärbt vor sich gehabt oder doch nur dann als solche anerkannt, während bei etwaiger Spiegeldifferenzirung die Nucleolen, oft begünstigt durch ihre Lage am Spindelpol oder in der Nähe der ruhenden Kerne, als Centrosphären gedeutet worden sind (z. B. ROSEN, II, Taf. IV, Fig. 2—4, 6). Schon die Spiegelfärbung granulärer Gebilde im allgemeinen wird wesentlich zur Klärung der Streitfragen beitragen; ich hoffe aber eine weitere Verständigung durch den Nachweis herbeizuführen, dass auch die Nucleolen, gleichviel ob noch im ruhenden Kern eingeschlossen

oder aus dem sich theilenden in das Cytoplasma ausgestossen, ebenso leicht und sicher Spiegelfärbung geben, wie die künstlichen Albumosegranula. Will man die Nucleolen in ruhenden Kernen bis zur Spiegelfärbung (Fig. 16 *a* und *b*) differenziren, so muss man sehr lange mit Eisenalaun entfärben, bis die Chromatinknäuel nahezu entfärbt sind. Man wird dann, je nach dem Grad der Extraction, die Spiegel der Nucleolen bald breit, bald winzig punktförmig vor sich haben, wie Fig. 16 *a* und *b* aus nebeneinanderliegenden Mutterzellen eines und desselben Antherenfaches von Lilium zeigt. Rosen (II, Taf. II, Fig. 7, III, Fig. 21, 26) hat bereits früher mit Jodgrün-Fuchsin und Differenzirung in saurem Alkohol solche Spiegelfärbungen der noch im Kern liegenden Nucleolen beobachtet, aber nicht richtig gedeutet. Er spricht (II, p. 238, 283) von Nucleolen-Höfen und möchte sie wohl allgemein als Vacuolen deuten. Ich zweifle keinen Augenblick, dass Fig. 21, Taf. III, Fig. 7, Taf. II bei Rosen eine Spiegelfärbung ist. Wenn nun diese Nucleolen während der Mitose ausgestossen werden, so verlieren sie natürlich die Fähigkeit der Spiegelfärbung nicht. Aber es nimmt, bald schneller, bald langsamer ihr Substanzreichthum ab, was uns nicht verwundern kann, da ja die Nucleolen allmählich im Cytoplasma sich lösen. Das beginnt wahrscheinlich, sobald sie aus der schützenden Kernmembran herausgetreten sind, wird aber recht ungleichmässig verlaufen, so dass auch die Färbfähigkeit bald langsamer, bald schneller sich vermindert und schliesslich so klein wird, dass selbst das empfindliche Eisenhämatoxylin nichts mehr zu leisten vermag.

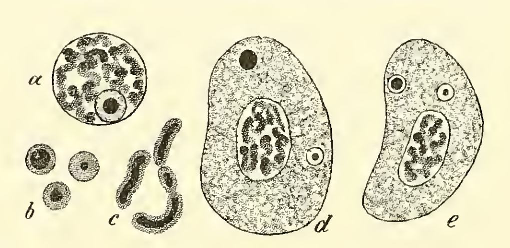


Fig. 16. Spiegelfärbung der Nucleolen und des Chromatines. Junge Antheren von Lilium candidum, Sublimatfixirung, Eisenhämatoxylin. *a* Spiegelfärbung des noch im Kern eingeschlossenen Nucleolus, Anfang des Knäuelstadiums. *b* Ebensolche Nucleolen aus anderen Kernen desselben Antherenfaches wie *a*, verschiedene Grade der Entfärbung und Spiegelgrösse. *c* Spiegelfärbung einiger Theilstücke des Chromatinknäuels. *d* und *e* Herausgeworfene Nucleolen, theils voll gefärbt (*d*), theils bis auf die Spiegel entfärbt (Guignard's sphères directrices). Vergr. *a*, *b*, *d* und *e* 600, *c* 1500.

Ob bei schnell aufeinanderfolgenden Theilungen, wie am Vegetationspunkt, in jungen Antheren etc. die herausgeworfenen Nucleolen bis zur nächsten Theilung vollständig gelöst sind, ist nicht recht wahrscheinlich. Es muss also die Zahl der auf verschiedenen Stadien der Verrottung und Lösung im Cytoplasma verstreuten Nucleolen allmählich zunehmen, stärker und schwächer färbbare, in allen Stufen neben einander. Ist der Process noch nicht weit gediehen, so wird es noch möglich sein, das Cytoplasma und seine Mikrosomen ganz zu entfärben, die Nucleolen aber vollgefärbt oder mit Spiegeln herauszuheben (Fig. 16 *d* u. *e*). Wenn aber die Verrottung oder Substanzverarmung der Nucleolen schon vorgerückt ist, dann können sie die Farbe nicht mehr lange genug halten, sie entfärben sich mit dem Cytoplasma und verschwinden für die Beobachtung. Wie viele Zwischenstufen hier möglich sind, bedarf wohl keiner besonderen Schilderung. Je nach den äusseren Ver-

hältnissen, unter denen die Pollenmutterzellen sich theilen, werden sicherlich auch die Nucleolen schneller oder langsamer verrotten. Höhere Temperatur wird sicher den Process beschleunigen; auch die Tageszeit, zu der das Material gesammelt wurde, wäre zu berücksichtigen, da man weiss, dass manche Objecte nur in den frühen Morgenstunden sich theilen.

Vollgefärbte und spiegelgefärbte Nucleolen werden gewiss oft neben einander in derselben Zelle vorkommen, ohne dass die Spiegelfärbung sie zu etwas besonderem, etwa Centrosphären stempelte. Man betrachte die beiden Abbildungen in Fig. 16 *d* u. *e*. In Fig. *e* haben die beiden Spiegel-Nucleolen eine Lage, wie sie auch für ein Centrosphärenpaar zulässig ist, die Spiegel sind ungleich gross. Die andere Mutterzelle (Fig. 16 *d*) enthält scheinbar nur eine Centrosphäre und einen Nucleolus, in Wirklichkeit aber zwei Nucleolen, von denen der eine noch vollgefärbt, der andere bis zum Spiegel differenzirt ist. Dass alle diese Gebilde zusammen gehören und nur herausgeworfene Nucleolen sind, wird wohl jeder zugeben. Würde man die abgebildeten Zellen noch stärker entfärbt haben, so würden die Nucleolen ganz verschwunden sein und die Chromatinknäuel der Kerne hätten jetzt Spiegel bekommen (Fig. 16 *c*). Ein Augenblick längerer oder kürzerer Wirkung des Eisenalauns ist hier entscheidend und das erklärt allein schon die Widersprüche zwischen den verschiedenen Beobachtern. Dazu kommen dann die schon besprochenen Einflüsse der Temperatur, der Tageszeit und manches andere, der Untersuchung sehr bedürftige. Man vergleiche meine Abbildungen (Fig. 16 *d* u. *e*) mit denen, die Guignard (I, Taf. X) von verwandten Objecten, Antheren von Lilium Martagon gegeben hat; man wird sofort erkennen, dass die sphères directrices und meine spiegeldifferenzirten Nucleolen dasselbe sind.

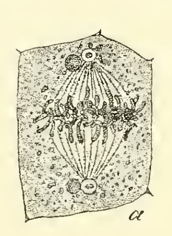
Die Lage der Nucleolen im Cytoplasma ist nach den Abbildungen von Zimmermann (I, Fig. 23), Karsten (I, Taf. XXIX, Fig. 5—7), Rosen (II, Taf. IV, Fig. 2—4, 6) während der Mitose sehr oft die von sog. Centralkörpern, also am Spindelpol, während der Kernruhe bleiben die Nucleolen oft in der Nähe des Kernes, was in allen solchen Zellen, deren Kern sehr gross im Verhältniss zum Zellumfang ist, nicht verwundern kann. Der Verdacht, dass wirklich diese herausgeworfenen Nucleolen nicht bloss fälschlich als Centralkörper beschrieben worden sind, sondern überhaupt zur Aufstellung der Lehre von den Centralkörpern wesentlich beigetragen haben, dass es mit anderen Worten Centralkörper überhaupt nicht giebt, kann kaum noch lächerlich erscheinen.

Guignard (I) hat bekanntlich bei zahlreichen Objecten, besonders auch an den riesenhaften Pollenmutterzellen der Liliaceen „sphères directrices" in schematischer Schönheit und Regelmässigkeit abgebildet, während viele Nachuntersucher, z. B. Mottier (II, p. 129), Juel (I, p. 210) trotz eifrigen Bemühens keine finden konnten.

Stasburger (IV, p. 393) fasst seine eigenen und seiner Schüler Beobachtungen dahin zusammen, „dass den Pteridophyten und den Phanerogamen, soweit zum mindesten die Untersuchungen reichen, individualisirte Centrosomen abgehen, dass dafür aber das Fadenwerk des Kinoplasmas bei diesen Pflanzen zu einer Ausbildung gelangt, welche eine anderweitige Anlage der Theilungsspindel ermöglicht." Merkwürdigerweise hat Guignard in seiner neuesten Arbeit (III, p. 215)

die von Nachuntersuchern nicht gefundenen bildschönen Attractionssphären der Liliaceen nicht von neuem untersucht, es findet sich nur folgender Satz: „Il est certain que, dans un grand nombre de cas, on n'aperçoit rien ou presque rien de nettement distinct; mais il en est d'autres où le doute disparaît et je crois que, dans cette question, une observation positive a une tout autre valeur qu'une observation négative." Das ist freilich viel weniger, als die Aufsehen erregende Hauptarbeit, die auf 9 Tafeln an jeder von der Theorie verlangten Stelle 1 oder 2 Centralkörper in verblüffender Reinheit darstellt, vermuthen liess. GUIGNARD's Bilder sind also ausgesucht und zusammengestoppelt, auch scheint der Zeichenstift sehr willfährig gewesen zu sein.

GUIGNARD hat in einer besonderen Arbeit (IV) Psilotum triquetrum nachuntersucht, um KARSTEN's Ansicht, dass die sphères directrices ausgestossene Nucleolen seien, zu widerlegen. Gerade an diese Arbeit GUIGNARD's müssen wir uns halten, um die Streitfrage mit Hilfe unserer neuen Beobachtungen über die Spiegelfärbung zu lösen. GUIGNARD (IV, p. 245) hat besonders günstige Färbungen mit einem Gemisch von Säurefuchsin-Methylgrün erhalten, in denen sich die Sphären roth oder rosa färben, ebenso die Nucleolen. Spiegelfärbung konnte, ähnlich wie mit BIONDI's Gemisch an dem Albumosechromat (Taf., Fig. 15) sofort simultan entstehen oder durch die lavage à l'alcool absolu herausdifferenzirt werden. GUIGNARD (IV, p. 247) bestätigt, dass die 3—4 Nucleolen, die gewöhnlich im ruhenden Kern vorkommen, während der Mitose in das Cytoplasma ausgestossen werden und nun hier theils in der Nähe des Spindelpols liegen, theils an anderen, uns hier nicht interessirenden Stellen. Besonders wichtig ist noch die Bemerkung (IV, p. 247): „Pendant la formation de la plaque nucléaire les nucléoles subissent ordinairement une diminution de volume; toutefois, un ou pleusieurs d'entre eux se montrent encore plus gros que les sphères, tout au moins pendant quelque temps (Fig. 2 et 4)." Das heisst doch aber weiter nichts, als die Grösse der herausgeworfenen Nucleolen ist ungefähr dieselbe wie die der Sphären. Das bestätigen auch die von GUIGNARD citirten Figuren 2—4, von denen ich die letztere, neben einer Zelle aus Fig. 1 hier (Fig. 17) reproducirt habe. Man ist überrascht durch die Aehnlichkeit der Nucleolen und Sphären, denn nach GUIGNARD's eigenem Urtheil liegt hier (Fig. 17 *a*) an jedem Spindelpol neben der sphère directrice ein ausgeworfener Nucleolus. Wodurch unterscheiden sich nach GUIGNARD's Ansicht (IV, p. 247, 248, 259) diese beiden? Die Nucleolen sind stets vollgefärbt, lassen kein „corpuscule central" erkennen; dieser ist allein den Sphären eigen und stets



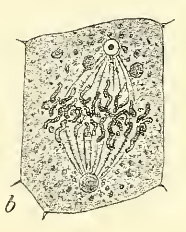


Fig. 17. Nach GUIGNARD (IV, Taf. II). *a* (Taf. II, Fig. 4) zeigt nach GUIGNARD an jedem Pol neben der sphère directrice einen ausgestossenen Nucleolus, in der Figur vollgefärbt, während die Sphäre aus einem centralen Körperchen und einem hellen Hof (nach meiner Auffassung Spiegelfärbung) besteht. *b*, rechte obere Zelle von GUIGNARD's Fig. 1, Taf. II hat am oberen Pol eine Sphäre, die nach GUIGNARD am unteren Pol von einem grossen Nucleolus verdeckt wird; in der Nähe des oberen Poles, an den Flanken der Spindel, liegen noch zwei solche Nucleolen. (Vergr. 600.)

von einem hellen Hof umgeben, der in GUIGNARD's Abbildungen, die mit seinen älteren übereinstimmen, in seiner ganzen Gestalt deutlich erkennen lässt, dass er einer Spiegelfärbung seine Entstehung verdankt. Die Grössendifferenzen, die GUIGNARD (IV, p. 248) anführt: grosse Nucleolen 4—5 μ, die kleinsten kaum 2 μ, Sphären 2,3 μ machen ja vielleicht zunächst einigen Eindruck, aber später (IV, p. 259) wird man durch folgende Bemerkungen über die Nucleolen enttäuscht: „la plupart surpassent de beaucoup en volume le corpuscule centrale des sphères“. Hier wird also nur der gefärbte Spiegel der Sphäre mit den ganzen vollgefärbten Nucleolen verglichen, während man vorher (IV, p. 248) im Zweifel ist, ob der helle Hof der Sphäre mit gemessen worden ist. GUIGNARD's Abbildungen lassen deutlicher als diese Angaben erkennen, wie minimal die Grössenunterschiede sind (vergl. auch Fig. 17 und die Figurenerklärung). Es schrumpft also schliesslich der ganze Unterschied auf die andere Färbung ein.

Keinem Zweifel kann es unterliegen, dass GUIGNARD's sphères directrices weiter nichts sind wie zur Spiegelfärbung differenzirte Nucleolen. Man könnte noch einwendend fragen, warum z. B. in Fig. 4 (Fig. 17 *a*, auch *b*) der wenig grössere Nucleolus noch vollgefärbt, der kaum kleinere bis auf den Spiegel differenzirt ist. Nach allem, was schon über die Spiegelfärbung gesagt wurde, ist das ja leicht erklärlich: 1) ist sicherlich der vollgefärbte etwas grösser, 2) könnte er ja von Haus aus dichter, substanzreicher gewesen sein, 3) könnte ihn die Verrottung noch nicht so weit erfasst haben wie den spiegelgefärbten, dem er vielleicht sehr bald ähnlicher geworden wäre. Auch hätte es ja nur einer wenig längeren Alkoholwirkung bedurft, um den Nucleolus in eine sphère directrice umzuwandeln, einfach durch Spiegeldifferenzirung. Wenn diese beiden Nucleolen langsam weiter verrotten und in der Nähe des fertigen Tochterkernes bleiben, so würden sie, jetzt wiederum bis zum Spiegel entfärbt, GUIGNARD's Sphärenpaar darstellen. Da in den Tochterkernen neue Nucleolen entstehen, die bei der nächsten Mitose wieder herausgeworfen werden und an den Spindelpolen sich festsetzen, so könnten die anderen von der vorhergehenden Theilung stammenden unterdessen ganz gelöst worden sein, ohne dass die Sphärentheorie darunter zu leiden hätte. Sie würde die neu herausgeworfenen Nucleolen als die an die Pole gewanderten Sphären, die am ruhenden Kern noch zusammenlagen, sogar besonders willkommen heissen.

Der Kern der wirklichen Mutterzellen soll nach GUIGNARD (IV, p. 257, Taf. II, Fig. 13) nur einen grossen Nucleolus haben und nichts soll darauf hinweisen, dass er vor der Spindelbildung herausgeworfen wird oder sich theilt. Das könnte ja eine Lücke in meine Beweisführung reissen, wenn nicht GUIGNARD selbst (IV, p. 258) sagte, dass man zuweilen auch jetzt am Spindelpol ein oder zwei, ziemlich grosse Körner vom Aussehen der Nucleolen neben der Sphäre fände. Das ist doch aber dasselbe wie oben und unterstützt nur von neuem meine Ansicht. Das Schicksal des einzigen grossen Nucleolus hat GUIGNARD gar nicht genauer verfolgt oder die Präparate zufällig soweit entfärbt gehabt, dass die kleinen Nucleolen schon ganz farblos waren.

Ich bleibe daher bei meiner Behauptung, dass GUIGNARD's Sphären wirklich herausgeworfene Nucleolen sind, die bis zur Spiegelfärbung entfärbt sind. KARSTEN's Vermuthung hat sich also bestätigt.

Auch die neueste Arbeit GUIGNARD's (III) hat mich in meiner Ansicht noch bestärkt. Gefärbt wurde mit BIONDI's Gemisch und mit angesäuertem Alkohol differenzirt, wodurch die beste Gelegenheit zur Spiegelfärbung gegeben war. Die Objecte (Antheren von Nymphaea, Nuphar, Limodorum, Magnolia) zeigten keineswegs regelmässig an den Spindelpolen die als Sphären gedeuteten Gebilde (III, p. 185, 190, 192, 197), ausserdem fanden sich (III, p. 192) zuweilen auch im Cytoplasma, ausserhalb der Theilungsfiguren, dieselben Gebilde, wie am Pol, ebenso gross, ebenso gefärbt. Alles das ist leicht erklärlich, wenn es sich um ausgestossene, verrottende Nucleolen handelt. In den nächsten Kapiteln wird noch zu untersuchen sein, warum die Nucleolen sehr oft in den Spindelpolen liegen und hier zu Centren für die Polstrahlen und die Spindelfasern werden. Zum Unterschied von anderen Sphären könnte man die GUIGNARD's als Spiegelsphären bezeichnen. Unwillkürlich wird man an herausgeworfene und verrottende Nucleolen erinnert, wenn man liest, was SHAW (I, p. 180) über die sog. Blepharoplastoiden sagt, also gut färbbare Körperchen, die den Blepharoplasten der Spermatiden ähnlich sehen, aber schliesslich ohne weitere Entwicklung in den Primärspermatocyten (Marsilia) verschwinden. Auch die Abbildungen, die SHAW gibt, rechtfertigen das Verlangen, dass diese Blepharoplastoiden und auch die Blepharoplasten einmal genau auf ihre Beziehungen zu herausgeworfenen Nucleolen untersucht werden. Soweit die Litteratur ein Urtheil gestattet, komme ich hierauf in dem Kapitel über die Centralkörper bei der Spermatogenese zurück. Auch Spiegelfärbungen scheint SHAW (I, p. 180, Taf. XI, Fig. 16 u. 18*a*) gesehen zu haben.

Auch die chromatoiden Nebenkörperchen, die vor kurzem v. LENHOSSÉK (I, Taf. XIII, Fig. 7, 9, 10, 15, Taf. XIV, Fig. 16—27) bei der Spermatogenese der Ratte beschrieben hat, sind sicherlich nur herausgeworfene Nucleolen. v. LENHOSSÉK meint, ihr färberisches Verhalten deute entschieden auf den Kern und besonders auf die Nucleolen hin (I, p. 261, 277), kann sich aber nicht dazu entschliessen, eine bestimmte Ansicht zu äussern. Ich glaube, wenn v. LENHOSSÉK die botanischen Arbeiten über den Nucleolus während der Mitose berücksichtigt hätte, dann hätte er selbst die chromatoiden Nebenkörperchen für herausgeworfene Nucleolen erklärt. Dass diese in den rasch mehrmals sich theilenden Spermatocyten auch in Mehrzahl im Cytoplasma sich finden und entsprechend ihrem Verrottungszustande bald besser, bald schlechter sich färben müssen, versteht sich nach p. 243 von selbst. Auch die Sphären die v. LENHOSSÉK (I, p. 235, 243, 245) schildert, müssten einmal genauer darauf untersucht werden, ob sie nicht entfärbte, vielleicht spiegeldifferenzirte Nucleolen sind. Besonders ist mir verdächtig, dass (v. LENHOSSÉK, I, p. 243) die Sphäre, nachdem die „Centralkörperchen" aus ihr ausgewandert und in die Spindelpole eingerückt sind, noch einige Zeit gut färbbar sich erhalten soll und schliesslich sich auflöst und „gleichmässig" im Cytoplasma vertheilt. Aus dieser gelösten Sphärensubstanz soll sich nun freilich nach v. LENHOSSÉK (I, p. 244) in den Tochterzellen je eine neue Sphäre reconstruiren. Ich würde zu untersuchen empfehlen, ob diese neuen Sphären nicht etwa neu herausgeworfene Nucleolen sein könnten.

Kapitel III. Die Polstellung der Centralkörper.

Aus der allgemein betonten, ausserordentlichen Kleinheit der Centralkörper einen Einwand gegen ihre Organnatur abzuleiten, wird man fast versucht, wenn man die Grössenverhältnisse gegenüber dem Kern sich überlegt. So verhält sich z. B. der Durchmesser des Centralkörperchens zu dem des Kernes im Bauchfell des Salamanders (Flemming, XX, Taf. XXXVIII, Fig. 2) wie 1 : 80, woraus sich, selbst für einen flach biconvexen Kern und kugligen Centralkörper ein sehr grosser Volumenunterschied ergibt. Aehnliche Missverhältnisse kommen auch sonst vor, so dass man sich wohl fragt, wie der Zwerg Centralkörper den Riesen Kern bezwingt. Jedoch möchte ich hierauf keinen Werth legen, weil man ja entgegenhalten könnte, dass auch grosse, kernähnliche Sphären vorkämen und dass die kleine Nervenzelle den Riesen Mensch beherrsche. Die Hauptaufgabe ist vielmehr die, zu zeigen, dass der Bau der mitotischen Figur und die Bewegungsvorgänge während der Kerntheilung auch vollkommen sich verstehen lassen, ohne ein besonderes kinetisches Organ, ohne Centralkörperchen und Sphäre.

1) Die Polstellung der Centralkörper während der Mitose ist, zunächst abgesehen von der Strahlung, gewiss überraschend und wird ja geradezu zum Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen gefärbten Körnchen des Cytoplasmas. Wie soll ein Körnchen, wenn es kein besonderes Zellorgan ist, das sich seine polare Lage selbst schafft, in eine so regelmässige Stellung gelangen?

Anknüpfend an die soeben besprochenen sphères directrices Guignard, die spiegel-gefärbte Nucleolen sind, wollen wir zunächst den Fall behandeln, dass die Polkörperchen aus dem Kern stammen, entweder Nucleolen oder andere, an der Chromosomen- und Spindelfaserbildung nicht theilnehmende Körperchen sind. Es wird wohl auf keinen Widerspruch stossen, wenn zunächst festgestellt wird, dass der Theilung stets ein mehr oder weniger auffälliges Wachsthum des Kernes vorausgeht und dass dieser in derselben Richtung, in der die Zelle sich am stärksten vergrössert, ebenfalls am stärksten wächst. Senkrecht zu diesem grössten Wachsthum theilt sich aber später die Zelle und auch ihr Kern, wesshalb man auch sagen kann, der Kern wächst am meisten parallel der Spindelaxe [1]). Ein Wachsthumsdruck, den der Kerninhalt auf die Kernwand ausüben würde, müsste also am stärksten an den zukünftigen Polen der Spindelfigur sein und hier gewissermaassen die Oeffnung der Kernmembran vorbereiten, zunächst durch stärkere Dehnung, so dass hier die Kernmembran schon durchlässiger für gelöste Stoffe sein könnte, wenn sie am übrigen Kernumfang noch unverändert ist. Besonders auffällig ist natürlich das Wachsthum des noch geschlossenen Kernes parallel der Spindelaxe in cylindrischen Zellen mit starkem Längenwachsthum, z. B. in Tradescantiahaaren, in denen nach Strasburger (I, p. 111) der Kern „oft fast bis auf das Doppelte“ sich streckt, bevor die ersten Umwandlungen in seinem Innern beginnen. Wenn dann die scharfe Umgrenzung des sich theilenden Kernes sich verwischt, fängt auch nach Strasburger (I, p. 112) das Cytoplasma an, sich deutlich an den Polen zu sammeln. Ebenso schildert auch Flemming (I, p. 199) zu einer Zeit (1882), als

1) Sehr schön auch an den Abbildungen von Davis (I, Taf. XVI, Fig. 1—6) zu sehen.

die Centralkörper noch nicht dominirten, dass ungefähr gleichzeitig mit der Knäuelbildung im noch geschlossenen Kern, die Anlage der Pole im Cytoplasma erfolgt, d. h. eine dicentrische Anordnung, Strahlung und in Eiern eine dotterkornfreie, helle Polstelle. Jetzt nimmt man ja an, dass die Centralkörper an die Pole gerückt sind und hier, das Commando über den Kern übernehmend, in den Strahlen einen Theil des Theilungsapparates anlegen oder aus sich selbst entwickeln. Das mag einstweilen auf sich beruhen, sicher ist, dass der noch nicht geöffnete Kern bereits auf das Cytoplasma gerade von den Stellen aus sichtbar einwirkt, die die Pole seines stärksten Wachsthums sind. Hier an diesen Stellen verschwindet nun in der That zuerst die Kernmembran vollkommen, wie GUIGNARD (I, p. 185), STRASBURGER (I, p. 368, II, p. 54, III, p. 169), DAVIS (I, p. 268) gesehen haben. Ich glaube, dass man hierauf noch weiter wird achten müssen, denn jetzt heisst es oft nur, dass auf einem gewissen Stadium die Kernwand geschwunden ist, ohne nähere Angabe, ob sie sogleich im ganzen Umfange sich löst oder bipolar. Dass das letztere die Regel ist, folgt auch aus der Lagerung der ausgestossenen Nucleolen, die ja sehr oft deutlich an den Spindelpolen liegen (sphères directrices). Durch die polare Oeffnung der Kernmembran wird es möglich, dass nicht bloss gelöste Stoffe, sondern auch körperliche Gebilde, wie die Nucleolen, hier hervorgedrängt werden und nun eine ganz regelmässige Lage als Polkörperchen einnehmen. Man wird, um diese Annahmen zu widerlegen, beweisen müssen, dass auch bei jeder beliebigen anderen, nicht bipolaren, Oeffnung der Kernmembran doch Centralkörperchen an den Polen vorhanden sind. Sobald sich aber allgemein bestätigen würde, dass der Kern sich zuerst an den zukünftigen Spindelpolen öffnet, dann wäre auch allgemein die Bedingung gegeben, dass aus dem Kern ausgestossene Körperchen in die reguläre Lage der „Centralkörper“ einrücken müssen, ohne besondere Organe zu sein.

Ein schönes Beispiel für das eben Gesagte liefern die von STRASBURGER (II) und SWINGLE (I) untersuchten schiefen Segmenttheilungen in der Scheitelzelle von Stypocaulon. STRASBURGER (II, p. 55, Taf. III, Fig. 5) bemerkt, nachdem er die Oeffnung der Kernmembran an den Polen bei gewöhnlicher Quertheilung erwähnt hat, dass nicht selten „die Astrophären in etwas seitlicher Lage“ an dem Zellkern stehen bleiben und dass dementsprechend auch die Stellen, an denen die Kernwand schwindet, einseitig verschoben sind. Es handelt sich hier nach STRASBURGER (II, p. 55, Anmerk. 1) um eine erste Vorbereitung zur Anlage eine Zweiginitiale, die durch eine schiefe, die Längsaxe der Scheitelzelle in spitzem Winkel schneidende Zellwand herausgeschnitten wird. Der Zellkern deutet nach STRASBURGER durch seine schräge Stellung bereits die Richtung an, in der die Scheitelzelle sich demnächst seitlich hervorwölben wird, während äusserlich noch nichts davon zu sehen ist. Die seitliche Lage der Astrophären und der ihnen entsprechenden Oeffnungen in der Kernwand möchte ich so deuten, dass die Scheitelzelle und mit ihr natürlich auch der Kern in der Richtung der zukünftigen Zweiginitiale am intensivsten gewachsen ist und dass dementsprechend auch der Kern an diesen neuen Wachsthumspolen zuerst sich öffnet, hier die Strahlungen sich einstellen und auch ein etwa ausgestossenes Körnchen an dieser Stelle als Centralkörper sich präsentiren müsste. Hier sind freilich neue Beobachtungen nöthig, da ja nach den schon erwähnten Untersuchungen SWINGLE's, die

Strasburger anerkennt, die Centralkörper ganz anders aussehen sollen. Aber selbst diese sonderbaren Gebilde (vergl. p. 237) haben bei Zweiginitialenbildung eine entsprechende Lage (Swingle, I, p. 315, Taf. XVI, Fig. 13, 14). Wenn diese Centrosomen wirklich als der gefärbte Rand von feinen Oeffnungen der Kernwand sich erweisen sollte, so wäre wiederum Kernöffnung und Wachsthumsrichtung des Kernes und der Zelle in der oben vorausgesetzten Uebereinstimmung. Ich bekenne gern, dass dieser und ähnliche Fälle noch einer ausführlicheren Besprechung bedürften, um zu überzeugen; aber ganz durften sie doch nicht übergangen werden.

2) Auch die regelmässige Lage der in thierischen Eiern sehr deutlichen Sphären würde sich ebenso erklären lassen; nur würde es schwieriger sein zu sagen, ob die Substanz der Sphären nur aus dem Kern stammt oder cytoplasmatisch oder gemischt ist. Ich erlaube mir daher noch folgende Betrachtung, von der selbstverständlich alle diejenigen Sphären, die wie Guignard's sphères directrices auf Spiegelfärbung beruhen, auszuschliessen sind. Auch die Sphären der Leucocyten sind besonders zu behandeln.

In den lebenden Eiern erscheint die Sphäre als ein heller, körnchenfreier Hof (O. Hertwig, V, p. 155; Flemming, I, p. 200), in dem in den fixirten Präparaten das Centralkörperchen liegt, umgeben von einer mehr oder weniger deutlichen Sphäre, die dem Umfange des lebend allein sichtbaren hellen Hofes entspricht und nach der Fixirung als feinkörnig punktirtes Gebilde sich darstellt (vergl. z. B. Boveri, II). Boveri hatte früher für diese Sphärensubstanz den Namen Archoplasma vorgeschlagen, ihn aber später (III, p. 41) für entbehrlich erklärt, jedoch an der „substanziellen Specificität" der Sphärenmasse gegenüber dem übrigen Cytoplasma festgehalten. Von anderen Forschern, z. B. von v. Erlanger (I, p. 342, 346) wird dieses Archoplasma nicht für einen besonderen Theil des Cytoplasmas gehalten, nach Heidenhain (I, p. 646—651) ist es weiter nichts als das um die Centralkörper centrirte Protoplasma. Die Sphäre in den Eiern würde also nach dieser Auffassung nicht ein besonderer Theil des Theilungsorganes „Centralkörper" sein, sondern nur das morphologische, im Cytoplasma hinterlassene Abbild von seiner Wirksamkeit. Das kinetische Zellorgan ist allein das Centralkörperchen.

Alle die vielen Widersprüche, die hier zwischen den verschiedenen Autoren noch bestehen, zu schildern, wäre wohl überflüssig, weil der in diesem Buche vertretene Standpunkt dadurch weder vertheidigt noch angegriffen werden könnte.

Die dichtere Substanzanhäufung an den Spindelpolen, um die sog. Polkörperchen, wird sicherlich mit der Oeffnung des Kernes zusammenhängen. So lange dessen Membran noch vollkommen geschlossen ist, wird sie nur gelöste Krystalloide oder ganz schwache Colloide hindurchlassen, alle stärkeren Colloide aber, die etwa im Kern gelöst sind, vollkommen gegen das Cytoplasma absperren und umgekehrt. Gelöste Nucleine, die bald ärmer, bald reicher an Nucleinsäure wir uns zu denken haben, können also aus dem geschlossenen Kerne nicht heraus, Albumine und Globuline aus dem Cytoplasma nicht hinein. Sobald aber die Kernmembran bipolar sich auflockert und endlich öffnet, können auch alle Colloide sich vermengen und auf einander wirken; zuerst und am stärksten an den Polen. Sicher hat es nichts abenteuerliches an sich, vorauszusetzen, dass an den Polen sehr leicht

vitale Ausfällungen, die sich sphärenartig um die Polkörperchen herumlegen, entstehen können. Auch fehlt es noch an jeder ausreichenden Garantie, dass die im lebenden Ei als helle, körnchenfreie Höfe erscheinenden Sphären nicht solche Stoffe gelöst enthalten, die von Fixirungsmitteln ausgefällt werden und so die „Polkörperchen" in „Archoplasma" einbetten. Bevor nicht alle diese Fragen verneint sind, hat die Zellforschung kein Recht, die Sphäre als ein besonderes Zellorgan aufzufassen. Besonders müssten zahlreiche Fixirungsmittel an demselben Object geprüft werden, um die Darstellbarkeit des Archoplasmas nach dem ersten Theil dieses Buches beurtheilen zu können. Boveri (II, p. 62, 63) und auch die Begründer der Sphärenlehre, van Beneden und Neyt (I) haben mit Essigsäure gearbeitet, auch die beliebtesten Fixirungsgemische enthalten Essigsäure, die alles aus den Kernpolen heraustretende Nuclein sofort unlöslich fällen müsste, während die Essigsäure, wenn sie stark ist und allein oder im Verein mit Alkohol wirkt, wie bei van Beneden und Neyt, keineswegs geeignet ist, nucleinfreie Bestandtheile des Cytoplasmas zu conserviren. Aus dem Kern austretendes Nuclein müsste aber schon durch schwach saure Reaction des Cytoplasmas vital ausgefällt werden und könnte sich dann in ihm als schwer veränderlicher Ballen lange erhalten. Man mag aus diesen wenigen Bemerkungen freundlich entnehmen, dass ich nicht aus einer angekränkelten Abneigung gegen die Organnatur der Sphären schreibe, sondern dass ich nur die Wege bezeichnen möchte, auf denen man vielleicht ein Schrittchen weiter kommen könnte. Auch die neuerdings von Davis (I) bei Corallina beschriebenen Sphären würden sich so erklären lassen.

3) Der andere Fall, dass cytoplasmatische Körnchen an die Pole getrieben werden und hier als Centralkörperchen sich festsetzen, ist viel weniger wahrscheinlich, als der, dass sie kernbürtig sind. Denn wenn der Kern an den Polen sich öffnet, so geschieht dies doch wahrscheinlich infolge eines starken Wachsthumsdruckes des Kerninhaltes auf die Membran. Durch die Oeffnung würde also zuerst der Kerninhalt in das Cytoplasma ausströmen, das erst später, vielleicht bald darauf, sich auch in das Kerninnere ausbreiten könnte. Es sind ja allerdings stets im Cytoplasma Körnchen eingestreut, die sich so färben, auch dieselbe Grösse und Form haben, wie diejenigen in Centralkörper-Stellung. Da nun aber einige dieser cytoplasmatischen Körnchen bei vorausgehenden Mitosen, ebenso wie die Nucleolen in den Sporen- und Pollenmutterzellen, aus dem Kern ausgestossen worden, andere dagegen rein cytoplasmatisch sein könnten, so wird es mit Hilfe der Färbungsmethoden wohl nur ausnahmsweise möglich sein, zu entscheiden, dass wirklich ein cytoplasmatisches Körnchen in die Polstellung eingerückt ist. Das klare Beispiel der aus Nucleolen entstehenden Spiegelsphären (p. 245) wird wohl auch für andere Objecte als Fingerzeig dienen können. Bleibt man hierbei stehen, so würde man nahezu mit denjenigen übereinstimmen, welche, wie O. Hertwig (V, p. 48, 165), eher dazu neigen, die Centralkörper als Organe des Kernes zu betrachten, die nur während der Mitose hervortreten, in die Tochterkerne aber wieder aufgenommen werden. Sobald man statt des Wortes Organ das Wort Theil setzt und unter Theil ein Gebilde wie den Nucleolus oder ein nucleolenähnliches Körnchen versteht, dann wäre die Uebereinstimmung ja eine vollkommene. Denn es wird wohl Niemand behaupten wollen, dass

die Nucleolen ruhende Centralkörper sind, die erst bei der Kernöffnung hervortreten und sichtbar zu functioniren anfangen. Die ausgestossenen Nucleolen sind sicherlich dem Untergang bestimmt und als Kernexcremente zu betrachten, die allem Anschein nach besonders zunehmen, wenn das „Chromatin“ sich zum Knäuel ausgestaltet. Eine ganz ähnliche Ansicht hat bereits HAECKER (II, p. 253, 256) ausgesprochen. Ihr stehen ja mancherlei andere Auschauungen gegenüber, die aber, soweit sie rein auf färbungsanalytischen Grundlagen ruhen, vollkommen in der Luft schweben. Hierher gehört z. B. die früher sehr verbreitete Annahme, dass die Nucleolen das Material zum Wachsthum des Chromatines liefern, oder dass sie, wie STRASBURGER (IV, p. 379) vermuthet, Reservematerial für das Kinoplasma sind.

Man wird mir vielleicht noch einwenden, dass die Centralkörper auch während der Kernruhe im Cytoplasma sich nachweisen und auf ihrer Wanderung an die zukünftigen Pole des der Theilung entgegengehenden Kernes verfolgen lassen. Ueber den ersten Punkt habe ich bereits ausführlich mich geäussert (p. 229—239, 243); die Wanderung aber ist doch nur aus zahlreichen Präparaten zusammengesucht, wobei man nicht berücksichtigt, dass, wie z. B. bei GUIGNARD's Spiegelsphären, die scheinbar auf ihrem Wege zum Pol erwischten Sphären ruhig an dem Flecke, an dem sie gerade vom Fixirungsmittel überrascht wurden, liegen bleiben und bis zur Unfärbbarkeit verrotten könnten, bevor eine neue Kerntheilung einsetzte. Die jetzt an den Polen hervorgetriebenen Nucleolen hätten mit diesen „wandernden“ Sphären also gar nichts zu schaffen.

Kapitel IV. Die Centralkörper als Theilungsorgane.

1) Wirkungsweise der Spindelfasern und Polstrahlen.

Es ist bekannt, dass nach VAN BENEDEN's (VAN BENEDEN und NEYT, I, p. 279, 280) Vorgange sich die Muskeltheorie der allgemeinsten Anerkennung erfreut, dass man den Spindelfasern und Polstrahlen Contractilität zuschreibt und hiermit die Wanderung der Chromosomen während der Mitose zu erklären versucht. Abseits von den zahlreichen Anhängern dieser Lehre steht BÜTSCHLI (III, p. 158—169), der, wie schon berichtet, die Strahlungen nur als durch Diffusionsströme umgeordnete und centrirte Wabenzüge betrachtet und Contractilität nicht voraussetzt, sondern die treibenden Kräfte der Zelltheilung, wie er schon früher (II, p. 415) es gethan, aus den Gesetzen für flüssige Massen, aus der Oberflächenspannung und ihren Aenderungen ableiten möchte. Hierüber verspricht BÜTSCHLI (III, p. 169) weitere Untersuchungen zu veröffentlichen. Er ist jedenfalls mit besonderem Nachdruck als der Einzige hervorgehoben, der die Contractilitätstheorie ablehnt.

Obgleich BOVERI (III, p. 50) selbst einräumt, dass VAN BENEDEN keinen Beweis für die Contractilität der Spindelfasern und Polstrahlen beigebracht habe, so ist er doch von dieser Eigenschaft anscheinend fest überzeugt und leitet (II, p. 121) die Wanderung der gespalteten Chromosomen gegen die Pole von der Contraction der an die Membran des Eies festgehefteten Polstrahlen ab. „Muskelähnliche“ Contraction ist das Schlagwort der neuesten Cytomechanik geworden

obgleich kein einziger Forscher, auch HEIDENHAIN nicht, Beweise für die Contractilität hat erbringen können. Immer roher sind die Vorstellungen über die Wirkungsweise der Fadengebilde in der karyokinetischen Figur geworden, wie der Streit erkennen lässt, der zwischen HEIDENHAIN, DRÜNER, RHUMBLER und Anderen über die specifische Wirkung der einzelnen Fasern- und Strahlensorten geführt wird, die bald ziehen, bald stemmen sollen, um die Chromosomen an den rechten Platz zu befördern. Das liest sich, als ob die zarten Chromosomen mächtige Baumstämme wären, die nur mit allen Hilfsmitteln der gröbsten Mechanik fortbewegt werden könnten. Dabei wird aber nicht beachtet, wie weit und mit welcher Geschwindigkeit die Chromosomen sich während einer Kerntheilung wirklich bewegen resp. bewegt werden.

Ein Maass für den Weg, den die Substanz eines Kernes während der Mitose zurücklegt, gibt die Entfernung der Mittelpunkte beider Tochterkerne von einander an. Aus zahlreichen Abbildungen lässt sich berechnen, dass dieser Abstand 8—43 μ beträgt und bei ein und demselben Object nur geringen Schwankungen von 5—10 μ unterliegt, wobei die schwankende Grösse der gleichwerthigen Zellen eines Objectes, von denen die verschiedenen Abbildungen stammen, zu berücksichtigen ist. Folgende Tabelle (p. 254) gibt in μ die Entfernung der Tochterkernmittelpunkte während der Tochterknäuel oder nachdem bereits die neuen Kernwände ausgeschieden worden sind. Berechnet wurde nach den von den Autoren angegebenen Vergrösserungen.

Eine ganze Zelltheilung, vom ersten Beginn der Kernveränderungen bis zur definitiven Ruhe der Tochterkerne verläuft nach FLEMMING (I, p. 270) in 2—5 Stunden, was wohl zu hoch ist. PEREMESCHKO (I, p. 449) schätzt nach Beobachtung an lebenden Tritonlarven die Zeitdauer für die Theilung einer gewöhnlichen Epithelzelle auf $2\,^1/_2$ Stunden, die der als Netzzellen bezeichneten Formen auf $1^1/_2$ Stunden. In den Staubfadenhaaren von Tradescantia braucht eine Theilung nach DEMOOR (I, p. 195) 80—100 Minuten, nach STRASBURGER's Angaben $1^1/_2$—$2^1/_2$ Stunden. Man wird also sicher weder zu hoch, noch zu tief greifen, wenn man der Einfachheit halber 100 Minuten als Theilungsdauer annimmt. In dieser Zeit würde nach obiger Tabelle die Kernsubstanz, specieller das Chromatin, einen Weg von 8—43 μ zurückzulegen haben, pro Minute also nur um 0,08—0,4 μ sich fortbewegen. Etwas schneller erscheint die Bewegung, wenn man ein besonderes, schnell verlaufendes Stadium heraushebt: die Wanderung der zur Kernplatte (Aequatorialplatte) vereinigten Chromosomen nach den beiden Polen. Diese Phase verläuft nach STRASBURGER's genauen Angaben (I, Figurenerklärung zu Taf. VIII) in etwa 10 Min. Auch ich habe an lebenden Tradescantiahaaren ungefähr die gleiche Geschwindigkeit beobachtet. Nach FLEMMING's (VII, p. 433, Taf. XVI, Fig. 2 *a*—*l*) Beobachtungen am Hautepithel der Salamanderlarve haben hier die Chromosomen dieselbe Geschwindigkeit, in 9—10 Min. waren sie aus der verdichteten Aequatorialplatte in die Sternform der Tochterkerne aus einander gewandert. Wenn man noch annimmt, dass die Kernplatte genau in der Mitte zwischen den beiden Tochterkernen gelegen hat, so würde also jedes Chromosom die halbe Entfernung der Tochterkernmittelpunkte von einander (vergl. Tabelle) in 10 Minuten zurücklegen. Daraus berechnet sich eine Geschwindigkeit von 0,4—2 μ pro Minute. Mehr wird wohl sicher nicht geleistet.

Entfernung der Mittelpunkte der Tochterkerne.
Als Maass für die Geschwindigkeit der Chromosomen.

Objecte	Entfernung der Kernmittelpunkte in μ	Autor
1) Wurzelspitze, Vicia faba	25	ZIMMERMANN, I, Fig. 30.
2) „ Hyacinthus	20	ROSEN, II, Taf. II, Fig. 11.
3) „ Phaseolus	8	„ II, Taf. III. Fig. 10.
4) Spaltöffnungsmutterzelle, Iris pumila	9	STRASBURGER, I, Taf. VIII, Fig. 66—69
5) Staubfadenhaare, Tradescantia	22—29	„ I, Taf. VIII, Fig. 44—46, 49—51
6) Sporenmutterzellen, Equisetum	15	„ I, Taf. IX, Fig. 136, 137
„ „	15—20	ZIMMERMANN, I, Fig. 40—42
7) Pollenmutterzellen, Fritillaria persica	22—25	STRASBURGER, VIII, Taf. I, Fig. 35—39
8) Pollenmutterzellen, Lilium Martagon	25—30	ZIMMERMANN, I, Fig. 20, 21
„ „	19—30	GUIGNARD, II, Taf. I, Fig. 19, Taf. II, Fig. 25
9) Embryosack, Lilium Martagon	35	„ II, Taf. IV, Fig. 103
„ „ „	31,5—38	STRASBURGER, I, Taf. IV, Fig. 104—107
„ „ „	31	ZIMMERMANN, I, Fig. 12
10) Nucellusgewebe, „ „	17—20	„ I, Fig. 45, 46
11) Embryosack, Monotropa	8	STRASBURGER, I, Taf. V, Fig. 125, 126
12) Endosperm, Nothoscordum	28—33	„ I, Taf. VII, Fig. 15—20
13) Oedogoniumfäden	25—33	„ I, Taf. XII, Fig. 55—57
14) Spirogyra	35—43	„ I, Taf. XI, Fig. 17—23
15) Epithel, Salamanderlarve	21	„ VIII, Taf. III, Fig. 212, 213
„ „	26	FLEMMING, I, Taf. VI, Fig. *n—o*
„ „	29	„ I, Taf. IIIb, Fig. 45
16) Thierisches Ei, Ascaris	18	v. ERLANGER, I, Taf. XVII, Fig. 3
„ „ Amphioxus	21	SOBOTTA, I, Taf. V, Fig. 30
„ „ Forelle	18	W. HIS, I, p. 468

Um diese Werthe würdigen zu können, wollen wir die Geschwindigkeit der Protoplasmabewegung in Pflanzenzellen und die Wachsthumsgeschwindigkeit der Wurzeln damit vergleichen.

Nach einer Zusammenstellung bei W. HOFMEISTER (I, p. 48) eilt die Strömung der Nitellen 1,5—1,63 mm in der Minute vorwärts, in Tradescantiahaaren hat das Protoplasma eine Geschwindigkeit von 0,65—0,83 mm, in den Brennhaaren der Nessel 0,3 mm, am langsamsten strömte es in den Blattzellen von Potamogeton crispus, 0,009 mm pro Minute. Selbst diese träge Bewegung (9 μ) übertrifft noch die schnellste[1]) der Chromosomen (2 μ) um 7 μ und würde sicher noch ausreichen, um diese vorwärts zu schieben. In den Staubfadenhaaren von Tradescantia strömt das Protoplasma nur in den sich

1) M. SCHULTZE (I, p. 46 u. 47) fand die Strömungsgeschwindigkeit im Nesselhaar 0,24—0,3 mm pro Minute, bei Tradescantia ebenso gross. In den Pseudopodien der Milioliden strömte das Plasma 0,4—0,9 mm pro Minute; erreicht also noch nicht die Nitellenströme.

nicht theilenden, unteren Haarzellen mit der Geschwindigkeit von 650—830 μ, während in den sich theilenden an der Spitze der Haare die Strömung so verlangsamt wird, dass sie nur durch längere Beobachtung einzelner Körnchen zu erkennen ist.

Sicher bewegt sich das Cytoplasma aber auch hier noch schneller als die chromatische Substanz, die nur mit 1,1—1,5 μ in der Minute wandert. Wollte man also eine selbstständige Bewegung der Chromosomen nicht voraussetzen und ihre Beförderung nur dem Cytoplasma zuschreiben, so würde dessen Strömungsgeschwindigkeit, selbst die geringste unter den beobachteten, mehr als ausreichend sein. Es bedürfte besonderer complicirter Mechanismen, wie sie in den muskelähnlichen Spindelfasern und Polstrahlen vielfach construirt werden, keineswegs. Um so weniger, als auch Grösse und Gewicht der zu bewegenden Chromosomen doch nur sehr gering sind. Nach STRASBURGER's Abbildung (III, Taf. II, Fig. 7, 8) der primären Kerne in den Pollenmutterzellen von Lilium candidum sind die Chromosomen, die zu den grössten im Pflanzenreiche gehören, 16—20 μ lang, 2—3 μ breit. In der Wurzelspitze von Vicia faba messen die Chromosomen (nach Fig. 30 in ZIMMERMANN, I) 7—10 μ und 0,6—1,3 μ, in Tradescantiahaaren (STRASBURGER, I, Taf. VIII) 15 μ und 1 μ. Oft sinkt die Grösse noch weit unter die angeführten Maasse herab, was aber unsere Frage nicht berührt, da sie sich doch vorerst mit dem Transport der grössten Chromosomen, als der schwierigsten Aufgabe für den Protoplasmastrom, zu beschäftigen hat. Ein grosser Bacillus kann als Ebenbild solcher Chromosomen gelten, wird wohl auch annähernd das gleiche specifische Gewicht haben, das hier einmal mit 1,1 angenommen sein soll. Ein grosses, 20 μ langes und 3 μ breites Chromosom von Lilium candidum würde dann nur $\frac{1}{5000000}$ mg wiegen, wobei noch vorausgesetzt ist, dass es in der lebenden Zelle dasselbe massive Körperchen war, als das es im fixirten Präparat erscheint. Da wir aber allen Grund haben, anzunehmen, dass die lebenden Chromoson viel wasserreicher, vielleicht halbflüssig sind, so würde ihr Gewicht noch kleiner werden. Solche leichte Körperchen wird selbst ein sehr langsamer Protoplasmastrom mit einer Geschwindigkeit von 0,4—2 μ in der Minute fortbewegen können.

Das Längenwachsthum der Pflanzen darf mit den internen Bewegungen im Cytoplasma nur dort verglichen werden, wo es noch mit Zelltheilungen verbunden ist, aber nicht mehr in der Zone der maximalen Zuwachse, wo die Streckung der Zellen, nicht mehr ihre Vermehrung, die Verlängerung bewirkt. Wir würden also nur die vordersten 3—4 mm einer Wurzelspitze vergleichen dürfen, als diejenige Zone, in der lebhafte Kerntheilungen sich abspielen. Theilt man eine Wurzelspitze von Vicia faba in 1 mm breite Zonen, so würde die erste in den ersten 6 Stunden sicher sich nicht verlängern, die nächst folgende könnte schon wachsen und ebenso die folgenden. Berechnet man nach den Beobachtungen von SACHS (I, p. 424) den Zuwachs eines Millimeters in 1 Minute im Durchschnitt aus der Verlängerung der 2., 3. und 4. Millimeterzone, so gibt der eine Versuch von SACHS 1,25 μ, der andere 0,64 μ, im Mittel also 0,95 = 1 μ; selbstverständlich nur ein wenig genauer Annäherungswerth, der durch speciell hierauf gerichtete Versuche noch genauer zu bestimmen wäre. Unsere Tabelle lässt aus der Entfernung der Tochterkerne (No. 1) vermuthen, dass die Chromosomen mit einer Geschwindigkeit von 1,25 μ in der

Minute wandern. Zu ergänzen sind einige Messungen, die ich an Wurzeln von Vicia faba, die mit Sublimat, Formaldehyd oder Alkohol fixirt waren, ausführte. Die Mittelpunkte der Tochterknäuel waren von einander entfernt: 12, 16, 14 μ (Sublimat), 16, 14, 16, 16, 16 μ (Formaldehyd), 14, 14, 14, 16 μ (Alkohol), im Durchschnitt 15 μ, woraus sich nach Obigem eine Chromosomengeschwindigkeit von 0,75 μ ableitet. Man sieht wiederum eine sehr schöne Uebereinstimmung mit der Wachsthumsschnelligkeit in der mitotischen Zone der Wurzelspitze (0,64—1,25 μ). Zum Vergleich sei noch nach Haberlandt (I, p. 56) berechnet, dass der allein wachsende, oberste Millimeter eines Wurzelhaares von Polygonum Fagopyrum in 2 Stunden sich so weit verlängerte, dass auf 1 Minute 0,8 μ kommt.

Diese Zahlen veranschaulichen in dem Auseinanderrücken der dem wachsenden Organ aufgesetzten Merkzeichen zugleich auch die Schnelligkeit, mit der das Protoplasma wächst und seine einzelnen Theilchen sich von einander entfernen. Man würde demnach aus der auffallenden Uebereinstimmung der Chromosomengeschwindigkeit mit derjenigen des Wachsthums wohl folgern dürfen, dass schon das allgemeine Wachsthum des Protoplasmas genügen könnte, um die Chromosomen während der Mitose nach den Tochterkernen zu befördern. Wiederum ein weiterer Fingerzeig dafür, dass die complicirten Mechanismen der neuen Zellenlehre keineswegs zur Erklärung der karyokinetischen Bewegungen und ihrer Geschwindigkeit nöthig sind. Da nun im Allgemeinen ausgewachsene Zellen sich nicht mehr theilen, und zur Wundheilung oder Regeneration stets ein neues, theilungsfähiges Meristem erst angelegt wird, so sind sicherlich die oben aufgedeckten Beziehungen nicht zufällige und rein äusserliche, sondern eröffnen wirklich einen neuen Ausblick auf die Vorgänge während der Mitose.

Nicht aus der Luft gegriffen, sondern für den ersten Anfang ganz ausreichend begründet erscheint es daher, die Bewegung der Chromosomen, falls man ihnen nicht eigenes Bewegungsvermögen zuschreiben will, von den allverbreiteten Eigenschaften der Bewegung und des Wachsthumes des Protoplasmas, an dem auch der Kern theilnimmt, abzuleiten.

Im Hinblick auf die künstlichen Strahlungen in Hollundermark würde noch hinzuzufügen sein, dass die den Zellleib aufbauenden Eiweisskörper unter gewissen Bedingungen zu strahliger Gruppirung neigen: Spindelfasern und Polstrahlen. Desshalb ist man nicht berechtigt, aus dem Verlauf dieser histologischen Strahlen und ihrer morphologischen Erscheinung allein eine mechanische Theorie der Mitose abzuleiten und die Strahlen mit dem contractilen Muskel zu vergleichen. Man kann derartige Voraussetzungen um so eher entbehren, nachdem die Langsamkeit und Leichtigkeit der Chromosomen einmal festgestellt worden ist.

2) Das kinetische Centrum.

Die Betrachtungen des vorigen Absatzes werden hoffentlich dazu beitragen, dass das Centralkörperchen als kinetisches Centrum etwas genauer besehen wird. Besondere Kräfte zum Transport der Chromosomen braucht die Zelle überhaupt nicht zu entfalten, denn die ganze Theilung des Kernes ist ein Wachsthum, dessen Richtung und Inten-

sität mit dem Wachsthum der ganzen Zelle gegeben ist. Denn auch in vielkernigen Zellen theilen sich doch die Kerne nur so lange, als die Zelle selbst noch wächst. Nur die Kern- und Zelltheilung sind „morphologisch" unabhängig von einander. Genau in der Richtung, in der solche mehrkernige Zellen wachsen, sind auch die Mitosen gestreckt. So berichtet z. B. Strasburger (I, p. 219), dass bei Saprolegnien die Kerne in der Längsrichtung des Schlauches gestreckt sind und auch die Mitosen, die Trow (I, Taf. XXIV, Fig. 2) abbildet, liegen mit ihren Polen in der Wachsthumsrichtung der stark in die Länge wachsenden Schläuche. Noch überzeugender tritt dieses Verhältniss in einer Abbildung hervor, die Strasburger (X, Taf. XII, Fig. 23) von den langgestreckten untersten Suspensorzellen von Orobuskeimen gegeben hat. Die 13 Kerntheilungsfiguren (Tochterkerne mit Verbindungsfäden), die in den beiden benachbarten Schlauchzellen sich finden, in einer 6, in der anderen 7, stehen, kleine Verschiebungen abgerechnet, mit ihrer Polachse parallel der Wachsthumsrichtung der langgestreckten Zellen. Wächst dagegen eine vielkernige Zelle, wie z. B. der endospermbildende Embryosack, nach allen Seiten, so sind auch die Polaxen der Mitosen verschieden gerichtet.

Es bedürfen also die Pol- und Spindelfasern gar keiner Kraftübertragung von einem kinetischen Centrum, das, wie wir noch sehen werden, auch gar nicht zu ihrer Erzeugung nothwendig ist.

Die feineren Spaltungs- und Umbiegungsvorgänge der Chromosomen muss ich einstweilen unberücksichtigt lassen, weil ich mir noch kein eigenes Urtheil über die allgemeine Bedeutung dieser Erscheinungen verschaffen konnte. Besonders hätte eine vergleichende Untersuchung über die Fixirung der Kerntheilungsfiguren festzustellen, ob diese von den verschiedenen Fixirungsmitteln ungleich insofern conservirt werden, dass diejenigen, welche Nucleine und Nucleinsäuren ausfällen, allein die feineren Erscheinungen an den Chromosomen verdeutlichen. Darauf wäre desshalb besonders zu achten, weil die Umbildung des ruhenden Kerngerüstes in den Knäuel und die Chromosomen allem Anschein nach als eine Entalbuminisirung des Nucleines aufgefasst werden muss. Vollkommen albuminfreie Nucleinsäure wird wohl nicht entstehen, aber das Albumin scheint so zurückzugehen, dass immer mehr und mehr die Nucleinsäure die Gestalt der, sei es vital, sei es artificiell, ausgefällten Gebilde beherrscht. Man vergleiche die Abbildungen der gefällten Hefenucleinsäure (Fig. 5, p. 43) mit den Kernknäueln und den Chromosomen und bedenke ausserdem, dass die Acidophilie des „Chromatines" sicher in dieser Form grösser ist, als im ruhenden Kern.

Kapitel V. Ursachen der histologischen Strahlung.

1. Allgemeine Uebersicht.

Als man noch nicht den starren Systemen huldigte, in die man gegenwärtig den feineren Bau der lebenden Substanz einzuzwängen versucht, da hatten auch die Ansichten über die Ursachen der histologischen Strahlungen einen weiteren Spielraum als jetzt. Man könnte als Motto einen alten Ausspruch Bütschli's hierher setzen, mit dem er Flemming's Meinung, dass die Strahlung eine gegebene Protoplasmastructur sei, zu bekämpfen suchte. Bütschli entgegnet (I,

p. 403): „Im Plasma, dessen Theilchen ihre gegenseitige Lage beständig zu wechseln fähig sind, kann man von Structurverhältnissen im gewöhnlichen Sinne nicht sprechen.“ Damals (1876, I, p. 414) erklärte Bütschli, „dass die strahlige Anordnung des Plasmas um die Centralhöfe der Ausdruck einer von diesen ausgehenden physikalisch-chemischen Aenderung des Plasmas sei, wobei eine allmähliche Abnahme dieser Aenderung von den Centralhöfen nach der Peripherie hin statthat, welche von ersteren aus unterhalten wird“. Die chemische Aenderung kann man doch aber nur in einer Bildung neuer Verbindungen erblicken, die in der protoplasmatischen Flüssigkeit entweder löslich oder unlöslich sind; Lösung und Fällung würden also den Gehalt des Plasmas an geformten Partikelchen beeinflussen. Die physikalische Aenderung des Plasmas aber, das nach Bütschli's damaliger Ansicht (I, p. 415) „den Grundgesetzen einer flüssigen Masse gehorcht“, müsste doch in einer gesetzmässigen Anordnung seiner Theilchen, z. B. in der Strahlung, zum Ausdruck kommen. Nicht anders vermag ich Bütschli's Darstellung zu verstehen, die von seiner heutigen Auffassung freilich sehr absticht. Denn jetzt steht er ganz und gar unter der Herrschaft seiner Wabentheorie, einer strengen Plasmastructur, und meint (II, p. 35—37, III, p. 158—169), dass Diffusionsvorgänge, die von den Centrosomen selbst hervorgerufen werden, die strahlige Centrirung der Protoplasmawaben bedingen. Das Centrosoma (III, p. 160) soll das Enchylema oder darin gelöste Stoffe in derselben Weise anziehen, wie eine hygroskopische Substanz Wasser, und die so „entstandene diffusionelle Wanderung“ soll das Strahlungsphänomen hervorrufen. Man erkennt deutlich noch die „chemisch-physikalische Aenderung“ der alten Fassung (I, p. 414), nur festgebannt in das Schema der Wabentheorie.

Nicht Neubildung, sondern nur Umordnung bestehender Structuren ist nicht allein bei Bütschli das Grundwesen der Strahlung, sondern auch bei allen denen, welche seiner Wabentheorie sich anschliessen, oder der Gerüsttheorie Flemming's zuneigen. Das kann nicht anders sein, sobald eine unabänderliche Grundstructur des Protoplasmas vorausgesetzt wird.

Eng an Bütschli drängt sich Rhumbler (I u. II) heran, dessen Eiertanz für die Wabentheorie gar ergötzlich anzuschauen ist. So soll (I, p. 569) der radiäre Zug, der die Wabenwände zu Strahlen orientirt und verdichtet, aus den tangentialen Wabenwänden Substanz herüberziehen, wodurch sie unsichtbar, „minimal dünn“ werden sollen. Das Centrosoma, durch sein Flüssigkeitsbedürfniss der Urheber der Strahlung (I, p. 577), soll später sein Imbibitionsstreben gesättigt haben, und darauf beruht „wohl einfach“ (I, p. 611) die Rückkehr der getheilten Tochterzellen in das Ruhestadium —.

Einen Compromiss zwischen Wabe und Faden schliesst Strasburger (IV, p. 375), indem er dem ganzen unthätigen Cytoplasma Wabenstructur zuschreibt, in der auch das wabige, unthätige Kinoplasma sich verberge. Erst wenn es activ werde, nehme es Fadenstructur an und ordne sich strahlig an.

Auch Ziegler (II, p. 264) ist bereit, die „Strahlung auf einer Aenderung der Structur der Zellsubstanz, speciell vielleicht auf der Bildung radiärer Fäden in dem Netzwerk oder auf einer radiären Ordnung der Waben“, beruhen zu lassen.

Flemming (XIII, p. 697) lässt die Polstrahlen entstehen, „indem

das Faserwerk der Zelle, das noch keine bestimmte Anordnung hat, zu ihnen gestreckt wird". Ihm schliessen sich alle diejenigen an, die seine Filartheorie angenommen haben.

Freier von dem Druck einer bestimmten Plasmastructur waren diejenigen, welche die Strahlungen für Strombahnen erklären. AUERBACH (1874, I, p. 221) sagt: „Die Strahlen um die Spitzen des Kernes sind eben der Ausdruck der Bahnen, innerhalb welcher feine Strömchen des Kernsaftes in das Protoplasma eindringen, die Dotterkügelchen entweder bei Seite schiebend oder vor sich her jagend." Bei dieser Auffassung erscheint das Protoplasma selbst also nicht strahlig angeordnet, nur die Dotterkügelchen des Eies. FOL (I, p. 340—349) möchte in den Strahlungen nicht bloss eine richtende Wirkung, die vom Kern resp. dem Centrum ausgeht, erblicken, sondern mehr den Ausdruck von wirklichen Bewegungen, die theils centripetal, theils centrifugal gerichtet sind und dem Protoplasma eine entsprechende Anordnung aufprägen. Dieser FOL'schen Annahme neigte auch früher STRASBURGER (I, p. 367) zu, ebenso BRASS (I, p. 174—176), auch BERTHOLD (I, p. 183) und andere. Besonders BERTHOLD konnte dieser Auffassung ungehindert sich zuwenden, weil er keine bestimmte, sozusagen fixe Structur des Protoplasmas annahm, sondern es als eine Emulsion betrachtete, in der dann bestimmt gerichtete Strömungen auch die emulgirten Partikelchen bestimmt orientiren mussten. Aber auch diese Erklärung läuft nur, wie alle anderen, auf eine Umordnung bereits vorhandener Theilchen hinaus.

Alle die erwähnten Anschauungen der Zellforscher lassen sich gar nicht mehr mit dem Vorgang der künstlichen Strahlung und seinen Ursachen versöhnen. Entweder entbehren unsere Nachahmungen doch der inneren Uebereinstimmung mit der histologischen Strahlung oder die Versuche, diese letztere zu erklären, haben gerade jene Bedingungen, welche dort erfüllt sind, übersehen, desshalb, weil man zu zäh an eine bestimmte Protoplasmastructur sich anklammert und nach ihr allein die Ursachen der Strahlung sich zurecht zu denken versucht. Wie unfruchtbar und einseitig man dabei wird, erhellt wohl am besten aus den Kräften, die man bei der Strahlung sich ins Spiel setzen lässt.

Die Bezeichnung Attractionscentrum führt die geläufigste dieser Speculationen uns vor, die durch O. HERTWIG's (V, p. 146) Vergleich mit den vom Magnetpol angezogenen Eisenfeilspähnen dahin verdeutlicht wird, dass man wirklich die Centralkörper als Sitz fernwirkender, anziehender Kräfte betrachtet. Ueber diese näher sich auszusprechen, fehlt freilich jede Möglichkeit. Nicht weiter würde man kommen, wenn man, wie HENKING (I, p. 198) einen Reiz voraussetzt, der vom sog. Attractionscentrum ausgeht. Mit HENKING würde man eingestehen müssen: „Welcher Art dieser Reiz ist, ob chemische Umwandlungen mit gleichzeitigen Strömungen ihn hervorrufen (wie es das Wahrscheinlichste ist) oder etwas anderes, darüber kann man ohne umfassende Nachuntersuchungen augenblicklich nur ziemlich werthlose Hypothesen äussern."

Auch die Annahme MARK's (I, p. 533), „that the force (sc. attractive) is generated by the fusion of two unlike substances — one of which is vitelline protoplasm, the other probably fluid constituents of the nucleus — and not by the attractive properties of either" —

setzt doch nur an die Stelle einer Anziehungskraft zwei und bringt wirklich neue Anschauungen nicht herbei. Nicht als Attractionscentrum, wie die meisten Cytologen, sondern als Imbibitionscentrum fasst Bütschli (II, p. 37, III, p. 160) und seine Schule das Centrosoma auf, das mit einem hygroskopischen Körper verglichen wird (p. 258).

Die Spermastrahlung des befruchteten Eies soll nach der neueren Richtung dadurch entstehen, dass mit dem Spermatozoid auch zugleich ein männliches Attractionscentrum eingeführt wird, um das sich nun das Eiplasma entsprechend gruppirt. Da es doch nahe liegt, mit Ziegler (II, p. 278) anzunehmen: „dass der Entwicklungsreiz des Spermatozoons auf einem chemischen Stoffe beruht, welcher mit dem Spermatozoon in das Ei kommt und sich alsbald in demselben verbreitet", so würde besonders die Spermastrahlung einmal nach dieser Voraussetzung zu betrachten sein. Das eingedrungene Spermatozoon würde, wie ein in Albumoselösung gelegtes Kryställchen von Sublimat (p. 224) als Diffusionscentrum wirken und wenn nun die von ihm sich ausbreitende gelöste Substanz mit gelösten Bestandtheilen des Eiplasmas eine unlösliche Verbindung gäbe, so müssten solche Selbststrahlungen, wie in meinem Versuch entstehen. Es könnte nun aber auch das Spermatozoon einfach als heterogener Körper wirken, durch den übersättigte Lösungen im Ei zur Ausfällung gebracht werden, vergleichbar der Strahlenweckung durch den Kernrest im Hollundermark. Sicher eröffnen die Versuche damit mancherlei Ausblicke auf das Strahlungsphänomen und tragen vielleicht dazu bei, es aus den Banden strenger Protoplasmastructuren zu befreien. Denn schon die Erfahrung, dass in einer ganz einfachen Albumoselösung durch chemische oder physikalische Fällung Strahlensysteme entstehen, sobald ein heterogener Körper als Ansatz dafür vorhanden ist, muss doch dazu nöthigen, auch die histologischen Strahlungen einmal auf dieser einfachen Grundlage zu betrachten. Freilich stösst man damit auf den Widerstand der Waben oder Fäden, aus denen das Protoplasma aufgebaut sein soll.

Es würde daher erst nöthig sein, noch weitere Experimente über künstliche protoplasmaähnliche Structuren hier einzuschalten. Da hierüber specieller in dem Abschnitt über die Polymorphie des Protoplasmas im II. Kapitel, 3 (Gemischte Structuren und Protoplasma) berichtet werden soll, so mag hier nur einiges, für das Folgende Unentbehrliche, vorausgeschickt werden. Erstarrte, 5—10-proc. Gelatine, in der Albumose gelöst ist, verhindert die Strahlung im Hollundermark nicht, wie die schöne tripolare Mitose unserer Fig. 18 *a* p. 265 beweist. Erst viel höhere Concentration der Gelatine hemmt die Strahlung (vergl. später). Stark viscose Beschaffenheit, z. B. verflüssigte Gelatine oder arabischer Gummi (5 Proc.) der Albumoselösung zugesetzt, beeinträchtigt die Strahlung gar nicht. Es würde also die sog. halbflüssige Consistenz des Protoplasmas unserer Erklärung nicht hinderlich sein. Wenn aber das Protoplasma wirklich schon im Leben von so dichten Gerüstwerken oder Schaumwänden durchsetzt wäre, wie die fixirten Präparate oft zeigen, dann könnten Strahlungen nach Art der künstlichen nicht entstehen (vergl. später); nur in Lacunen, in denen das Gerüst sehr locker ist oder ganz fehlt, wäre auch jetzt noch die Möglichkeit für solche Strahlungen gegeben. So feste Grundstructuren, wie die Präparate uns vorführen, sind aber sicher im lebenden Protoplasma, dessen Aggregatszustand doch immer der einer Flüssigkeit

bleibt, sicher nicht vorhanden. Auch ist damit zu rechnen, dass die Kerntheilung und andere mit Strahlung verlaufende Zellprocesse mit mancherlei Lösungs- und neuen Fällungsvorgängen verbunden sind, so dass vorübergehend selbst festere Structuren stark gelockert werden und nun eine Strahlung gestatten. Wir können daher mit vollem Recht die histologische Strahlung auf solche Ursachen zurückzuführen versuchen, die die künstlichen Strahlungen hervorrufen.

Wir haben 2 Arten davon kennen gelernt, die Selbststrahlung und die Fremdstrahlung, zu denen noch Bütschli's Gelatinestrahlungen hinzukommen. Ueber diese letzteren bitte ich im letzten Abschnitt die Besprechung der Wabentheorie, besonders den ganzen Artikel über die Gelatine vergleichen zu wollen. Nur sei schon jetzt bemerkt, dass Bütschli's Lehre von der elementaren Wabenstructur der erstarrten Gelatine und die hierauf aufgebaute Erklärung der Strahlungen nicht richtig ist, wie ich später beweisen werde. Ich werde daher im Folgenden nur die Selbststrahlung nach meinen Versuchen mit den Capillaren (p. 223) und mit Sublimatkryställchen (p. 224) und die Fremdstrahlung um den oder die Kernreste im Hollundermark mit der histologischen Strahlung zu vergleichen haben.

2. Die Fixirung der histologischen Strahlungen.

Wenn in einer lebenden Zelle keine gelösten Eiweisskörper vorhanden sind, dann können die Fixirungsmittel auch keine Fällungsartefacte erzeugen, auch keine Strahlungen. Sind solche schon in der lebenden Zelle zu sehen, wie z. B. die Sperma- und Furchungsstrahlungen in thierischen Eiern (z. B. Flemming, IX, p. 11, 30, Fol, I, Taf. V, Fig. 10 *d*, Taf. VI, 1—8, O. Hertwig, I, p. 380, Taf. II, Fig. 7, 8, O. u. R. Hertwig, I u. s. w.), so ist es zweifellos, dass sie auch vom Fixirungsmittel conservirt werden, genau wie die in Fig. 18 *b*, p. 265 abgebildeten, durch Neutralisirung erzeugten Globulinstrahlen sich in Platinchlorid unverändert halten. Wenn nun aber die vital schon sichtbaren Strahlungen von einem Protoplasma umspült werden, das Eiweisskörper gelöst enthält, so werden diese natürlich gerinnseliggerüstig ausgefällt und betten die Strahlen in sich genau so ein, wie bei vielen unserer Markversuche (vergl. Fig. 11—13). Die Zellstrahlungen werden also nach der Fixirung in einem viel dichteren und fester gefügten Protoplasma zu verlaufen scheinen, als im Leben wirklich der Fall war. Es können sogar die Strahlen theilweise verdeckt werden.

Schwieriger wird die Controle aller derjenigen Objecte, die lebend die Strahlen nicht erkennen lassen oder überhaupt lebend nicht ausreichend untersucht werden können. Das gilt für die meisten Polstrahlen und Spindelfasern. Flemming (VII, p. 372, Taf. XVI, Fig 6 *a*) hat zwar während der Theilung lebender Zellen der Salamanderlarve einige Male deutlich radiäre Anordnung von Pigmentkörnchen, Fetttröpfchen und dergleichen gesehen. Ja Demoor (I, p. 195) behauptet sogar, an lebenden Staubfadenhaaren von Tradescantia die achromatische Spindel und die Polstrahlung gesehen zu haben. Strasburger dagegen, der dieses Object zu wiederholten Malen eingehend studirt hat, bemerkt auch in seiner neuesten Schilderung (VII, p. 606), dass weder die Spindelfasern noch die Polstrahlung lebend zu sehen sind. Auch ich habe bei Tradescantia nichts davon bemerkt. Sicher ist, dass an lebenden

Mitosen nur recht spärlich wirklich deutliche Strahlungen und Spindelfasern gesehen worden sind. Sie könnten ja verdeckt oder infolge ungünstiger Lichtbrechungsverhältnisse unsichtbar sein. Hierfür würde ja sprechen, dass an den günstigen Eiern mehr davon zu sehen ist. Aber jedenfalls ist man berechtigt zu fragen, was das Fixirungsmittel noch hinzufälschen könnte. Selbst die beliebtesten unter ihnen, auf denen beinahe unsere ganze neuere Mitosenforschung beruht, Flemming's und Herrmann's Gemisch wirken in verschiedenen Tiefen dickerer Objecte ungleichmässig, besonders auf die Strahlungen, wie aus einer Bemerkung Drüner's (II. p. 275) unzweifelhaft hervorgeht: „Die am meisten peripher gelegenen Zelllagen sind für feinere, auf die Structur der Spindel gerichtete Untersuchungen gänzlich unbrauchbar. Nur die chromatischen Schleifen treten scharf und gut gefärbt hervor, alles andere ist bis auf spärliche Reste zerstört und in einen feinkörnigen Detritus verwandelt. In der Spindel erkennt man nur selten Fasern, die aber viel zu undeutlich sind, als dass man über ihren Verlauf irgend etwas Sicheres angeben könnte. Von Polkörperchen und Polstrahlen ist auch nur wenig zu erkennen.“ So weit Drüner, der mit Flemming's Lösung ganze Salamanderhoden fixirt hatte und in 2—3 Zelllagen tiefer gelegenen Partien schöne Strahlungen etc. fand. Hier liegt doch zweifellos am Rande die stürmische Wirkung der Chromsäure vor, während im Inneren die langsamer fällende Osmiumsäure, angesäuert von der Essigsäure des Gemisches, reinlichere Bilder gab. Die Frage, was ist hier Natur, was Kunst, ist doch sicher berechtigt. Dass Chromsäure allein das Strahlungsphänomen nicht conservirt, ersieht man auch aus folgender Anmerkung Flemming's (III. p. 704, Anm.). Er verglich ältere, mit Chromsäure fixirte Präparate mit neueren aus seinem Gemisch und fand in den ersteren nur unschön erhaltene Attractionssphären, zuweilen eine verwaschene radiäre Structur, aber keine Strahlungen, die mit den schönen der neuen Präparate sich hätten vergleichen lassen.

Rabl (II, p. 255) wundert sich, dass er schöne Kernspindeln in Chromameisensäure erhielt, dass aber von ihnen keine Spur nach Platinchloridfixirung ($^1/_3$ Proc.) zu sehen war. Diese wenigen Beispiele, die jeder aus seiner eigenen Erfahrung ja leicht vermehren kann, mahnen doch zur Vorsicht gegenüber den fixirten Strahlungen. So lange man die künstliche Erzeugung von Strahlungen aus Eiweisskörpern und Fixirungsmitteln nicht kannte, fehlte ja auch eine sichere Handhabe für die Kritik der Präparate. Nunmehr aber scheint mir eine Revision auch dieses Kapitels der Zellenlehre durchaus nothwendig zu sein, denn alle Bedingungen für Fällungsstrahlungen sind während der Fixirung gegeben. Gelöste Eiweissstoffe aller Art in den Zellen, langsam eindringende Fixirungsmittel von theilweise geringer Reactionsgeschwindigkeit und heterogene Körper in Form von Zellkernen, Attractionssphären, Chromosomen etc. zum Anschiessen der Strahlen. Ich möchte in dieser Beziehung nicht zu schwarz malen, aber so viel muss selbst ein Optimist eingestehen, dass die in die feinsten Details der Strahlung und des Spindelfaserverlaufes sich verlierende Forschung gar manches blendende Artefact schon als ganz naturgetreu beschrieben haben könnte.

Im Folgenden soll auf solche Artefacte kein Gewicht gelegt und vorausgesetzt werden, dass die typischen Strahlungen und Fasern der

mitotischen Figuren in der lebenden Zelle schon vorhanden und von den Fixirungsmitteln naturgetreu conservirt worden sind.

3. Die bipolare Spindel.

Die Entwicklung der typischen bipolaren Spindel, wie sie oft beobachtet und als theoretisches Schema aufgestellt worden ist, mit je einem Centralkörperchen am Pol, den Polstrahlen und den Spindelfasern soll zunächst ohne Rücksicht auf die kleine Centralspindel, die Herrmann (II, Taf. II, Fig. 8 etc.) zwischen den beiden Centralkörperchen beschrieben hat, auf vitale Fremd- und Selbststrahlung untersucht werden.

Die Fremdstrahlungen im Hollundermark haben gelehrt, dass ein morphologisch wohl umschriebenes Gebilde, das zum Centrum strahliger Gruppirung wird, keineswegs allein und ausschliesslich durch fernewirkende Anziehungskräfte oder durch besondere Imbibitionseigenschaften dazu befähigt wird, sondern dass schon sein Dasein überhaupt genügt. Der Kernrest im Mark greift weder chemisch, noch durch die Erregung von Diffusionsströmen in die Strahlenbildung ein, sondern wirkt nur durch sein Dasein, als Treffpunkt der von der Zellperipherie herankommenden Diffusionsströme und als Wecker der Fällung in der übersättigten Lösung (p. 218). Dabei ist es ganz gleichgiltig, ob stark fällende Fixirungsmittel oder ob nur sanfte Umschläge in der chemischen Reaction der Lösung die Uebersättigung herbeiführen. Besonders die Neutralisirungsstrahlungen aus Albumin, Globulin, Casein sind hier zu erwähnen, weil Umschläge in der chemischen Reaction des Protoplasmas, besonders während der sicher von starken chemischen Umwälzungen begleiteten Kerntheilung wohl vorausgesetzt werden können. Zur Fremdstrahlung gehört aber noch, dass in eine Lösung eines Stoffes, in der der Strahlenwecker schwebt, ein Fällungsmittel hineindiffundirt. Die Strahlenanordnung in der bipolaren Spindel ist nicht derartig, dass man hier wirklich eine Fremdstrahlung annehmen könnte. Denn wenn während der Knäuelvorbereitung etwa, zu einer Zeit also wo die ganze Kernwand noch geschlossen ist, durch Stoffe, die aus den Nachbarzellen eindringen, im Protoplasma gelöste Eiweisskörper ausgefällt würden, so müsste der ganze Kern zum Centrum der Fremdstrahlung werden. Dass solche circum-nucleäre Strahlungen, die man für Fremdstrahlungen halten könnte, wirklich vorkommen, geht aus Beschreibungen hervor, die Guignard (I, p. 183. Taf. XII, Fig. 44—47, Taf. XVII, Fig. 94), Osterhout (I, p. 160, Taf. I, Fig. 3), Mottier (I, p. 193, Taf. V, Fig. 45, 46, II, p. 128, 132, Taf. II, Fig. 3, 7), Korschelt (III, p. 28, Taf. IV, Fig. 76) gegeben haben. Gerade diese Strahlungen sind als Fixirungsartefacte nicht ganz unverdächtig.

Sie könnten aber auch Selbststrahlungen des Kernes sein, dadurch hervorgerufen, dass aus dem Kern irgend ein Stoff allseitig hervordringt, der mit cytoplasmatischen Stoffen unlösliche Verbindungen eingeht. Der Kern wirkte dann ebenso wie ein in Albumoselösung gelegtes Kryställchen von Sublimat (p. 224), nur würde in der Zelle alles viel feiner und zarter werden, als bei unseren plumpen Versuchen. Eine solche Selbststrahlung des Kernes könnte nun sehr wohl auch die Polstrahlung sein, die sich desshalb auf die beiden Pole beschränkte, weil an ihnen allein die betreffende Kernsubstanz

in das Cytoplasma eindiffundirt. Jeder Kernpol würde also so wirken, wie eine Capillare, durch die man z. B. Osmiumsäure in eine Albumoselösung fliessen lässt (vergl. p. 223). Das Verhalten der Kernpole hat uns schon mehrfach beschäftigt. Wir fanden, dass viele Beobachter angeben, dass hier der Kern sich zuerst öffnet, ja, dass schon vor der Oeffnung des Kernes das Cytoplasma an den zukünftigen Spindelpolen sich ansammelt oder doch anderes Aussehen annimmt (p. 248—250). Als Beispiel hierfür erinnere ich auch noch an das, was Flemming (I, p. 200) früher beschrieben hat.

Sobald der Kern sich aber öffnet, müssen auch gelöste Stoffe aus dem Cytoplasma in den Kern vordringen und damit wäre, falls unlösliche Verbindungen zwischen Plasma- und Kernstoffen entständen, auch die Möglichkeit gegeben, dass die Chromosomen als Strahlenwecker wirken und zum Ansatz der Spindelfasern, der achromatischen Fäden werden. Unter diesen würden dann diejenigen, welche nicht an Chromosomen sich ansetzen und gewissermaassen erst am Gegenpol geweckt werden, als Centralfasern erscheinen. Man würde bei einer solchen Auffassung zu dem Ergebniss kommen, dass die achromatischen Strahlen sowohl aus Kern- als aus Cytoplasmastoff zusammengetzt sind. Damit würde man sich von anderem Ausgangspunkte aus den Ansichten nähern, die z. B. Boveri (III, p. 25), besonders auch Strasburger (III, p. 169, 170) geäussert haben. Der letztere fand sogar an demselben Object (Galanthus nivalis, Embryosäcke), dass die Spindel bald im ganz geschlossenen Kern sich bildete, bald unter Betheiligung des Cytoplasmas. Ist der Kern noch ganz geschlossen, so würde die Fremdstrahlung, die die Spindelfasern erzeugt, darauf beruhen, dass aus dem Cytoplasma von den Kernpolen aus, deren Wandung doch schon gelockert und permeabler geworden sein könnte, Stoffe in den Kern eindringen, die sonst erst nach dessen Oeffnung eintreten.

Es sind also vielerlei Möglichkeiten für Fremd- und Selbststrahlung gegeben, sobald man zugesteht, dass unlösliche Eiweissverbindungen ausgefällt werden. Die Bedingungen hierfür könnten sehr mannigfaltig sein. Zuerst kämen einfache Aenderungen in der chemischen Reaction in Frage. Kern- und Cytoplasma könnten gerade entgegengesetzt reagiren; fast könnte es scheinen, als ob die starke Substanzausscheidung, mit der doch die Knäuelbildung verknüpft ist, auf einen Uebergang alkalischer in saure Reaction hinwiese. Ferner könnte auch, wie schon p. 257 erwähnt, eine Entalbuminisirung des Kern-Nucleines die Theilung begleiten und sehr albuminarme gelöste Nucleinsäure mit zuströmenden Albumin oder Globulin wieder zu unlöslichen Nucleinen sich vereinigen. Jedenfalls würde man nicht in Verlegenheit sein, wenn man solche Möglichkeiten noch weiter ausmalen sollte.

Das Centralkörperchen wurde bisher nicht beachtet, weil auch ohne dieses sicher Strahlungen, besonders in Pflanzenzellen, auftreten. Wenn ein besonderes Körperchen im Centrum der Strahlen liegt, so könnte es ja wirklich als Strahlenwecker gedient haben; es könnte aber auch erst secundär in diese Stellung gelangt sein. Man bedenke z. B., dass der Kern noch geschlossen ist, dass aber von seinen Polen aus eine Selbststrahlung in das Cytoplasma sich ausbreitet und dass jetzt erst der Kern bipolar sich öffnet und ein Nucleolus oder ein anderes färbbares Körnchen des Kernes an den Polen herausgedrängt wird. Es müsste jetzt als mehr oder weniger deut-

liches Centrum der so schon auf die Kernpole centrirten Strahlung erscheinen.

Was für regelmässige, an Kerntheilungsfiguren lebhaft erinnernde Bilder schon die einfache Fremdstrahlung im Hollundermark geben kann, wurde schon besprochen. Hier möchte ich nochmals die Aufmerksamkeit darauf lenken aus einem besonderen Grunde. Die Strahlungen, die in der lebenden Zelle etwa zuerst bei der Oeffnung des Kernes oder schon bei der Auflockerung seiner Wand an den Polen entstehen, könnten sehr bald wieder vergehen, etwa gelöst werden, und es könnten während ein und derselben Mitose mehrmals Strahlungen entstehen. Nur scheinbar würden diese, wenn man verschiedene fixirte Stadien vergleicht, durch den ganzen Theilungsvorgang hindurch, von Anfang bis zu Ende, ausdauern und so anscheinend eine wichtige Rolle dabei spielen. Wenn die Chromosomen zu den Tochtersternen auseinanderwandern, könnten sich zwischen ihnen, genau wie zwischen 2 Kernresten im Hollundermark (Fig. 18),

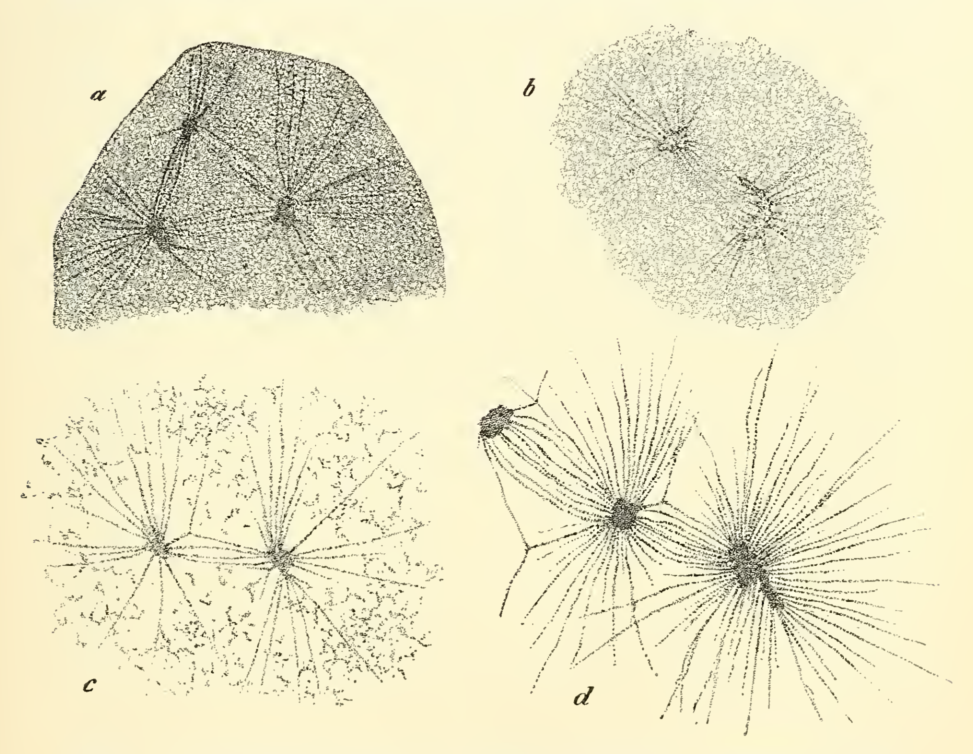


Fig. 18. Nachahmung karyokinetischer Figuren. Erklärung p. 222.

ganz neue Fremdstrahlungen spindelfaserartig ausspannen, an denen die Chromosomen entlang zu gleiten schienen. Dennoch könnte es so sein, dass die Chromosomen, wie schon entwickelt wurde (p. 256), einfach der allgemeinen Wachsthumsbewegung des ganzen Zellinhaltes gemäss auseinanderrückten und dass in einem bunten Wechselspiel chemischer Processe nothwendig Strahlungen zwischen ihnen und ebenso von ihnen aus nach der Zellperipherie sich entwickeln müssten,

Strahlungen, die weder contractil noch sonst activ wären, sondern nur eine polymorphe Erscheinungsform der Eiweisskörper des Protoplasmas im Zustande der Fällung. Man vergleiche einmal die in Fig. 18 dargestellten künstlichen Mitosen mit beliebigen Abbildungen wirklicher Mitosen, man wird doch etwas überrascht sein. Ich möchte einstweilen über diese kurze Skizze nicht hinausgehen; ich hoffe aber bestimmt, dass es gelingen wird, die Spindelfasern und Polstrahlen der bipolaren Spindel nach den hier angedeuteten Anschauungen noch weiter aufzuklären.

4. Einige besondere Fälle.

Zur weiteren Verständigung über die Ursachen der histologischen Strahlung wird es vielleicht beitragen, wenn ich noch an einigen besonderen Fällen meine Erklärung zu entwickeln versuche. Es scheinen mir hierzu besonders drei geeignet: die Centralspindelanlage nach den Schilderungen Hermann's, die Strahlungen um das Centralkörperchen der Leucocyten und die multipolaren Spindelanlagen.

1) Die Centralspindelanlage, die Hermann (II) an den Spermatocyten des Salamanders ausführlich beschrieben hat, tritt zuerst deutlich hervor, wenn in dem substanzreichen, dichten Protoplasma, das Hermann als Archoplasma betrachtet, eine Lakune sich bildet, in der bis auf die wenigen, sehr zarten Strahlen der Centralspindelanlagen alle geformten Theile zu fehlen scheinen (Hermann, II, Taf. XXXI, Fig. 4). Aus den weiteren Abbildungen Hermann's (II, Taf. XXXI, Fig. 4—10) geht deutlich hervor, dass von dieser ersten Lacune aus allmählich sich das Cytoplasma auflockert und ärmer an gerüstigen, eine Strahlung hemmenden, festen Einlagerungen wird. Selbst wenn alle die gerüstigen und gerinnseligen Theile, die Hermann abbildet, schon in der lebenden Zelle ausgeformt wären, was ich durchaus bezweifle, so müssten neue chemische Fällungen genau solche Strahlungsbilder geben, wie Hermann darstellt. Denn einerseits ist der Kernknäuel als strahlenweckender Fremdkörper vorhanden, andererseits einige ausgestaltete, gerade an der Uebergangszelle zum dichten Protoplasma liegende Körnchen, die wegen des Strahlenansatzes als Centralkörperchen gedeutet werden. Ebensolche Körnchen liegen im dichteren Protoplasma, können aber nicht zu Strahlencentren werden, weil die Beschaffenheit des Plasmas keine freie Bahn für die Strahlung gewährt.

Die erste Ansammlung von „Archoplasma“ ist hier sicher schon die Folge eines Stoffaustausches zwischen Kern und Cytoplasma, denn Hermann (II, p. 572, 573) beschreibt selbst, dass hier zuerst die Kernmembran schwindet, und leitet sogar die Verschiebung des Kernknäuels von Flüssigkeitsströmungen ab, die hierdurch hervorgerufen werden, die Chromatinfäden werden „an die entgegengesetzte Kernseite, wo die Kernmembran ihre Selbständigkeit am längsten beibehält, gewissermaassen angeschwemmt“. Hier gibt also Hermann recht grobe, von keinem besonderen Zellorgan hervorgerufene Wirkungen zu. Sobald die offene Verbindung von Kern und Cytoplasma hergestellt ist, müssen vielerlei chemische Processe einsetzen. Einer davon kann auch darauf hinauslaufen, dass die Substanz des Archoplasmas wieder gelöst wird, wesshalb die zuerst kleine, allmählich sich dehnende Lacune entsteht, in der die Centralspindelanlage sich entwickeln muss.

sobald wieder neue Processe zu partieller Fällung führen. Ich spreche von Lacune, nicht von Vacuole, weil ich nur im Allgemeinen einen von festen Gebilden freien Raum im Protoplasma bezeichnen möchte. Man vergleiche die später zu schildernde Lacunenbildung in Caseingerüsten, die schliesslich doch auch eine Vacuolisirung ist.

2) Leucocyten könnten ihre „Sphäre" verschiedenen Umständen verdanken. Auf den einen, das Zugrundegehen von Kernfragmenten wurde schon p. 239 hingewiesen. Anderen Ursprunges sind wohl die von Flemming (III, Taf. XIV) abgebildeten Attractionssphären. Allen diesen Abbildungen ist, soweit das Cytoplasma überhaupt eingezeichnet ist, gemeinsam, dass das Centralkörperchen mit seiner Strahlung gewissermaassen in einer Lacune liegt, die frei von den filaren Gebilden des sie umsäumenden Cytoplasmas ist. Wenn in diesem auch Körnchen von der Grösse des Centralkörperchens liegen, aber keine Strahlung sie umgibt, so würde sich das wieder daraus erklären, dass die dichter zusammengedrängte Filarmasse die Strahlenentwicklung verhindert. Wenn aber in der Sphären-Lacune ein Körnchen schwebt und es werden in der Lacunenflüssigkeit gelöste Eiweisskörper vital ausgefällt, so ist Strahlung unvermeidlich, ohne dass das „Centralkörperchen" dabei irgendwie als Organ eingreifen müsste. Sein Dasein als Wecker der Strahlung genügt in diesem winzigen Lacunenraum ebenso wie das des Kernrestes in der viel grösseren Hollundermarkzelle.

Warum im Leucocytenleibe nur eine solche Lacune, die man vielleicht sogar als grössere Vacuole bezeichnen könnte, sich bildet, warum diese bei gebuchteten oder ringförmigen Kernen meist eine bestimmte Lage einnimmt, das aufzuklären, würde es einer umfangreicheren Untersuchung bedürfen, die auch erst festzustellen hätte, ob nicht eine grössere Mannigfaltigkeit besteht. Ich habe selbst keine Leucocyten auf Centralkörper untersucht und habe sie hier nur desshalb kurz erwähnt, um zu zeigen, dass meine Deutung auch ihnen gegenüber nicht in Verlegenheit geräth.

3) Multipolare Spindelanlagen, früher als Abnormität geltend, werden jetzt als normale Vorstufen der typischen zweipoligen Spindel aufgefasst (z. B. Mottier, I, p. 176 flg., Guignard, III). Ich werde mich hier auf die letzte Arbeit Guignard's beschränken, weil hier auch die Beziehungen der sphères directrices zu den multipolaren Spindeln beschrieben werden. Mottier (I, p. 183) hat keine Centralkörper gefunden, Osterhout (I, p. 161) sagt, dass an den Vereinigungsstellen der Spindelfäden gewöhnlich „weder eine Verdickung noch besondere Körperchen" zu sehen sind, dass sie aber in einigen Fällen, wo sie vorhanden waren, keine besondere Bedeutung haben, weil solche Körperchen überall im Cytoplasma zerstreut sind.

Man hat zwei Fälle zu unterscheiden: die multipolare Strahlung um den noch vollkommen geschlossenen Kern (Guignard, III, Taf. X, Fig. 18; Osterhout, I, Taf. I, Fig. 6) und diejenige, nachdem die Kernwand geschwunden ist (Guignard, III, Taf. X, Fig. 21, 23; Osterhout, I, Taf. I, Fig. 8). Ob ein Spindelfaden, der zuerst vom geschlossenen Kern ausstrahlt, als solcher fortbesteht bis nach der Lösung der Kernwand, oder ob während dieser Uebergangsstadien alte Strahlen verschwinden, neue wieder gebildet werden und in Wirklichkeit also die Strahlung fortwährend wechselt und nur mehr oder weniger beständig erscheint, wenn man verschiedene Bilder mit einander vergleicht, alles das ist durch die Untersuchung des fixirten Materiales

nicht zu entscheiden. Aber ich halte es, ebenso wie für die bipolaren Strahlungen, doch am wahrscheinlichsten, dass alte und neue Strahlen zu dem jeweiligen Gesammtbilde sich vereinigen.

Guignard fand, sowohl an den multipolaren Strahlungen um den geschlossenen Kern, als auch bei den späteren Stadien in den Polen bald ein besonders sich abhebendes Gebilde, das an eine sphère directrice erinnerte, bald nichts. So sagt er z. B. von Limodorum abortivum (III, p. 191): „A l'extrémité de plusieurs d'entre les branches du fuseau, on aperçoit souvent un granule ou un petit amas de substance plus colorable que le reste de cytoplasme. Ces petits corps sont de grosseur inégale: plusieurs ont un ou deux corpuscules entourés d'une zone hyaline; mais cette auréole transparente est peut-être due à l'action des réactifs. Il y a des fuseaux pluripolaires dont les branches ne laissent apercevoir aucun des corps en question, ou n'en possèdent qu'au sommet quelques-unes d'entre elles" (Taf. X, Fig. 13). Aehnliches beschreibt Guignard für Nymphaea (III, p. 180), für Magnolia (III, p. 194). Guignard ist geneigt, die an den Polen der zwei- und mehrpoligen Spindeln nicht immer, aber gelegentlich auftretenden Körper als kinetische Centren aufzufassen, obgleich, wie er selbst erwähnt (III, p. 192, 213) ebensolche Körperchen im Cytoplasma verstreut vorkommen. Besonders sei folgender Satz noch hervorgehoben (Guignard, III, p. 213): „On ne peut objecter que les petits corps, plus ou moins différenciés, qui sont en rapport avec les fils extérieurs au noyau, au début de la formation pluripolaire ne représentent autre chose que ces granules à reactions nucleolaires qu'on voit souvent dans le cytoplasme au cours de la division, car on les trouve à un moment où le noyau possède encore sa membrane et son nucléole intacte." Guignard beachtet es nicht, dass bei früheren Theilungen herausgeworfene Nucleolen längere Zeit im Cytoplasma auf verschiedenen Stadien der Verrottung sich erhalten und so ausreichende Gelegenheit haben, als Fremdkörper Strahlung hervorzurufen, sobald vom Kern aus Stoffe in das Cytoplasma diffundiren, und neue, unlösliche Verbindungen mit cytoplasmatischen gelösten Stoffen bilden Wenn diese Annahme richtig wäre, dann, so könnte man einwenden, müsste aber in jedem Pol einer pluripolaren Spindel ein solcher Fremdkörper als Strahlenwecker liegen. Da die Verrottung der herausgeworfenen Nucleolen immer fortschreitet, auch nachdem einer zum Centrum einer Strahlung geworden ist, so könnte sehr wohl die letztere fortbestehen, der Nucleolus aber ganz gelöst werden oder bis zu solchen schemenhaften Resten zusammenschwinden, dass die Färbung ihn nicht mehr gegenüber dem Cytoplasma herausheben kann. Ausser vergehenden Nucleolen könnten auch andere granuläre Bestandtheile des Cytoplasmas zu Centren von Spindelpolen werden, aber doch nur dann, wenn sie eine gewisse Grösse haben, nicht zu winzig sind. Denn in letzterem Falle würden die Körnchen (Mikrosomen) zwar als Wecker für etwaige Ausfällungen dienen, aber doch nur zu Knotenpunkten von gerüstigen Fällungen werden, weil die Oberfläche der Körnchen zu klein ist und zu wenig Ansatzpunkte für eine deutliche Strahlung darbietet. Als weitere Bedingung käme dann auch noch hinzu, dass das umgebende Cytoplasma keine oder doch nur wenige geformte, gerüstige oder schaumige Structuren umschliesst und daher die Strahlung gestattet. Sehr deutlich tritt das an den Abbildungen Osterhout's (I, Taf. I, Fig. 4—10) hervor.

Die multipolaren Strahlungen könnten aber noch auf andere Weise dadurch entstehen, dass die ausgestossenen Nucleolen sich lösen und so von ihnen aus Substanzen gegen den Kern diffundiren. Es würden dann gewissermaassen Selbststrahlungen sich bilden, während die zuerst besprochene Entstehungsart Fremdstrahlungen gibt, vergleichbar denen im Hollundermark.

Je mehr Nucleolen von früheren Theilungen her noch im Cytoplasma liegen, um so zahlreicher müssten die Spindelpole werden: die multipolare Spindel müsste zunächst entstehen. Da nun aber, wie p. 243 auseinandergesetzt wurde, das Tempo, in dem die Nucleolen verrotten, je nach Temperatur, Tageszeit und anderen noch zu erforschenden Bedingungen wechselt, so wird man an demselben Object bald allgemein, bald seltener solche multipolare Vorstufen zu sehen bekommen. Sie alle würden für den ganzen Theilungsvorgang nur die Bedeutung einer unausbleiblichen Nebenerscheinung haben.

4) Abnorme Strahlungen. Eng an die multipolaren Spindelanfänge schliessen sich die Bilder an, die Meves (III, Taf. VIII, Fig. 17—19) von gewissen Zuständen der „Attractionssphäre" im Salamanderhoden (Ende Sommer) gegeben hat. Die Sphärenmasse ist in zahlreiche Stücke zerbröckelt, und zwischen diesen spannen sich feine cytoplasmatische Fäden aus; jeder Sphärenbrocken wird gewissermaassen zum Centrum einer mehr oder weniger deutlichen Strahlung. Ob hier wirklich die Natur treu conservirt worden ist, oder ob das Fixirungsmittel (Hermann'sche Lösung) die Fremdstrahlung hervorrief, können erst weitere Untersuchungen lehren. Die citirten Abbildungen (Taf. VIII, Fig. 17—19) machen auf mich durchaus den Eindruck, dass Artefacte vorliegen. Ausnahmslos lassen sich jene Unregelmässigkeiten, die Juel (I, Taf. VI—VIII) an den Pollenmutterzellen von Hemerocallis fulva studirt hat, mit den von mir entwickelten Ansichten über die Ursachen der Strahlung erklären. Dasselbe gilt für die in den bereits p. 202 citirten Arbeiten beschriebenen Abnormitäten, wie die sog. Herbeiholung abgesprengter Chromosomen etc.

Es blieben noch zwei Fälle übrig, in denen der Verlauf der Fasern oder Strahlen sich mit meinen Ansichten auf den ersten Blick nicht recht zu vertragen scheint. Zunächst verkrümmte und verbogene Spindeln (z. B. Carnoy, I, p. 350, Fig. 43—45; Guignard, III, p. 184, Taf. IX, Fig. 15, 17). Solange nicht sicher nachgewiesen ist, dass die Fasern schon während des Lebens so bogen- oder S-förmig verliefen und nicht erst durch vom Fixirungsmittel hervorgerufene Strömungen verschoben und verbogen worden sind, so lange wird man diese Abnormitäten nicht gegen meine Auffassung anführen können. Auch die Contractilitätstheorie wird mit diesen sonderbaren Bildern nichts anzufangen wissen, denn auch sie muss voraussetzen, dass die contractilen Fäden gerade gestreckt oder höchstens sanft bogig verlaufen, genau wie unsere Strahlungen im Hollundermark.

Die Scheidewand sich theilender Embryozellen von Phaseolus setzt sich nach Strasburger (I, p. 108, Taf. VIII, Fig. 25—35) zunächst an die eine Zellwand an und verlängert sich allmählich durch das Zelllumen hindurch bis zur gegenüberliegenden Wand. Hierbei erscheinen nach Alkoholfixirung höchst sonderbare Fädensysteme, die in dem Maasse, in dem die Zellwand sich vorschiebt, ebenfalls sich verbreitern und recht fremdartig aussehen (z. B. Fig. 31, 32, Taf. VIII).

Betrachtet man die citirten Abbildungen genau, so wird man sehen, dass die kurzen geraden oder sanft gebogenen Fäden einerseits an die Zellplatte, andererseits an eine davon nicht weit abstehende protoplasmatische Grenzlinie sich ansetzen. Es sieht so aus, als ob in der schmalen, nur $^1/_6$—$^1/_7$ der ganzen Zelle messenden Gürtelzone, in der die neue Querwand sich abscheidet, besondere Processe sich abspielen müssten, die in ihrer Wirkung nicht auf das übrige Cytoplasma morphologisch übergreifen können. Wenn in dieser engen Zone unlösliche Stoffe gefällt werden, dann müssten sie schliesslich auch nach den hier verfochtenen Principien solche fädige Figuren hinterlassen, wie Strasburger abbildet. Auch bleibt zu bedenken, ob nicht der Alkohol die ursprünglich reineren Figuren etwas verschrumpft und verunstaltet hat.

Kapitel VI. Die Centralkörper in der Spermatogenese.

Die neueren Anschauungen, die das Centralkörperchen zu einem der wichtigsten Organe in der Zelle zu erheben versuchen, mussten nothwendig dazu führen, ihm auch eine hervorragende Rolle in der geschlechtlichen Fortpflanzung anzuweisen. Da um das eingedrungene Spermatozoon im thierischen Ei eine Strahlung sich bildet, so ergab es sich fast von selbst, den Antheil aufzusuchen, den das Centralkörperchen am Aufbau des Spermatozoons hat. Die neueren Arbeiten hierüber (Meves, IV, VI, v. Lenhossék, I, Hermann, III, Suzuki, I) weichen zwar in einigen, hier nicht zu besprechenden Nebendingen von einander ab, stimmen aber doch im Allgemeinen darin überein, dass das Centralkörperchen wesentlich an der Entwicklung und dem Aufbau des Spermatozoons betheiligt ist. Die Methoden, mit denen dieses Ergebniss als ausreichend begründet gewonnen wurde, sind keine anderen, als die p. 229 kritisirten, und laufen schliesslich darauf hinaus, dass ein als Centralkörperchen bestimmtes Gebilde sich in gewisser Weise umändert, und dass diese neuen Gebilde sich gegenüber der Färbung, in erster Linie dem Eisenhämatoxylin, ebenso verhalten wie die ursprünglichen Centralkörperchen. Da nun die Färbungsmethoden rein physikalische Grundlagen haben, so berechtigen sie, wie schon p. 231 dargelegt wurde, keineswegs dazu, solche Schlüsse zu ziehen, wie etwa den, dass der Hermann'sche Ring, weil er sich färberisch ebenso verhält, wie das massive schwarze Körperchen, aus dem er entstand, ein Derivat des Centralkörperchens ist. Würde man die Entwicklung des Spermatozoons ohne Kenntniss der Centralkörperhypothese zu beschreiben haben, so würde man etwa folgendermaassen verfahren. Der Inhalt der Spermatide hat aus biologischen Rücksichten auf ein möglichst kleines Volumen sich zu verdichten und dabei eine Gestalt anzunehmen, die einerseits für die Bewegung, andererseits für den Uebertritt in das Ei besonders günstig ist. Die Entwicklung der Spermatide zum Spermatozoon ist also eine Volumenverminderung, die irgendwo in der Spermatide beginnen muss. Durch die Verdichtung der Zell- und Kernsubstanzen aber bekommen diese neue physikalische Eigenschaften, die auch in ihrem Färbungsvermögen sich äussern müssen. Je enger sich die Masse zusammenzieht, um so fester wird sie auch die Farbe halten, um so länger wird sie auch mit Eisenhämatoxylin schwarz bleiben. Die besonderen Theile des

Spermatozoons werden sicher sogleich bei ihrer ersten Anlage, die auf ein winziges Körnchen sich beschränken kann, möglichst dicht sein und dementsprechend sich färben, ohne dass hieraus etwas für die Centralkörperlehre folgen müsste. Irgend eine Gestalt muss aber der erste Anfang doch haben.

Hier ist an die schon von Anderen hervorgehobene Uebereinstimmung mit der Spermatogenese bei den Pflanzen anzuknüpfen. Einige Untersucher, wie Ikeno (I, p. 571), leiten ebenfalls gewisse Anfänge von Centralkörpern ab, während Andere, wie Belajeff (I, p. 142), Shaw (I, p. 181), diese Annahme als unzureichend begründet verwerfen oder doch stark bezweifeln und das als Centralkörperchen gedeutete Gebilde, von dem die Cilien entspringen, als Blepharoplast (Webber, citirt bei Shaw, I, p. 177) bezeichnen und einstweilen als ein besonderes Organ betrachten. Ueber die Blepharoplastoiden, die Shaw (I, p. 180) in den Spermatocyten von Marsilia fand und ihre muthmaassliche Beziehung zu ausgestossenen Nucleolen wurde schon p. 247 gesprochen. Aber auch die echten Blepharoplasten, die später sich strecken, die Cilien entwickeln und als deren Träger den Körper des reifen Spermatozoons aufbauen helfen, haben, solange sie noch kugelig sind, eine ausserordentliche Aehnlichkeit mit Nucleolen (vergl. Shaw, I, Taf. XI, Fig. 15, 16, 16a; Belajeff, I, Taf. VII, Fig. 1, 2). Man wird zu der Vermuthung gedrängt, dass das Material der ausgestossenen Nucleolen zu der Cilienbildung verwendet wird, und dass das Cytoplasma, das doch als der Baumeister der nicht kernbürtigen Theile des Spermatozoons anzusehen ist, neue verdichtete Substanz an den Anfang ansetzt. Die Uebereinstimmung mit den Beschreibungen der Anatomen ist eine überraschend grosse und verstärkt nur meine Ansicht, dass auch die Entwicklung der thierischen Spermatozoen ohne die Centralkörperhypothese vollkommen sich deuten lässt und dass diese hier, wie bei der Mitose, ganz entbehrlich ist.

Auch die Spermastrahlung im befruchteten Ei ist erklärlich ohne ein strahlenerregendes Centralkörperchen, das mit dem Spermatozoon eingeführt wird. Hierüber vergl. man p. 260.

III. Abschnitt. Die Polymorphie des Protoplasmas.

Die gegenwärtig besonderes Ansehen geniessenden Theorien über den Bau des Protoplasmas haben trotz aller scheinbar unversöhnlichen Gegensätze in der morphologischen und allgemein theoretischen Begründung doch einen gemeinsamen Charakter: sie alle streben dahin, den Bau der lebenden Substanz monomorph erscheinen zu lassen. Ebenso wie Altmann in allen Zellstructuren die granulären Elemente (Bioblasten) nachzuweisen sich bemüht, ebenso hält Flemming die filare und gerüstige Ausgestaltung für die herrschende und nur gelegentlich hinter anderen secundär erscheinenden Bauformen sich versteckende. Bütschli's Wabenlehre setzt überall einen entsprechenden Bau voraus, dessen Veränderung mit dem Fortbestand des Lebens unvereinbar ist. Nur die von Berthold (I) entwickelte Emulsionstheorie ist dazu befähigt, auch eine polymorphe Gliederung des Protoplasmas anzuerkennen und

den Wechsel in der morphologischen Erscheinung mit ihren Voraussetzungen zu erklären. Obgleich sich BERTHOLD gegen die Gerüsttheorie, die vorwiegend Artefacte behandle, ausspricht, so verlässt er doch nicht den Boden seiner Theorie, wenn er (I, p. 62 u. 175) die Möglichkeit anerkennt, „dass auch im normalen Lebensverlauf im Plasmakörper gelegentlich Differenzirungsproducte oder Ausfällungen in Form feiner Gerüste auftreten können". Ebenso urtheilt BERTHOLD (I, p. 61) über etwaige granuläre Beimengungen (Mikrosomen), die bald feste, amorphe oder krystallinische Ausscheidungen, bald tropfenförmige Gebilde sein könnten, oft jedenfalls nur vorübergehende und „sehr ephemere" Bildungen. Im Allgemeinen würden nach BERTHOLD (I, p. 65) alle solche Ausscheidungen, denen sich noch Vacuolen, Oeltropfen u. s. w. anreihen, als Entmischungsvorgänge in der protoplasmatischen Emulsion aufzufassen sein. Diese muss also polymorphe Bilder sowohl im Leben als erst recht nach der Fixirung geben.

Durch solche verschieden gestaltete, bald länger bestehende, bald schneller wieder verschwindende Ausfällungen, deren Aggregatszustand vom zähflüssigen bis zum festen schwanken wird, wird im Allgemeinen die physikalische Grundeigenschaft des Protoplasmas, die einer Flüssigkeit, nicht aufgehoben, nur würden auf gewissen Entwicklungszuständen die fester erscheinenden Ausfällungen so zunehmen und zu solchen Gebilden sich zusammenlagern können, dass der Wunsch zahlreicher Zellmorphologen nach einem fester gefügten Bau des Lebensträgers erfüllt sein könnte.

Geht man in der Geschichte der Protoplasmalehre zurück, so wird man finden, dass erst die allgemeine Einführung der Fixirungsmittel jene Theorien, die eine solidere Elementarstructur für unentbehrlich halten, zu stützen vermochte, während man vorher an dem flüssigen Aggregatszustande des Protoplasmas, den das lebende Material uns immer und immer wieder anzuerkennen zwingt, keinen Anstoss genommen hatte. Aus dem ersten Theil dieses Buches wird man erkannt haben, dass alle Fixirungsmittel die Eiweisskörper ausfällen und zwar in Formen, die bald der Granulatheorie, bald der Gerüst- und Filartheorie förderlich sein könnten. Hieraus ergibt sich von selbst die Nothwendigkeit, die lebende Zelle zu studiren, wenn man den natürlichen und ursprünglichen Bau des Protoplasmas ermitteln will. Sollte sich dabei herausstellen, dass das Protoplasma wirklich polymorph ist, so hätten damit die monomorphen Theorien alle Berechtigung verloren und alles, was diese auf einseitigen Voraussetzungen erklären und deuten, müsste von neuem behandelt werden, soweit es nicht bereits durch ältere, jetzt bei Seite geschobene Anschauungen dem Verständniss näher gebracht war.

Kapitel I. Die Polymorphie des lebenden Protoplasmas.

Um die Polymorphie des lebenden Cytoplasmas und der Kernsubstanz nachzuweisen, bedurfte es keiner neuen Untersuchungen; es wird genügen, aus der grossen Fülle des von anderen

Forschern Beschriebenen einige Beispiele herauszugreifen. Dabei ist selbstverständlich von allen sog. paraplasmatischen Einschlüssen, wie Stärkekörnern, Oel- und Gerbsäuretropfen, Pigmentkörnern, Krystallen u. dergl. abzusehen und nur das zu beachten, was zweifellos oder doch sehr wahrscheinlich ein activer Bestandtheil des wirklich lebensthätigen Protoplasmas ist. Ebenso sind anerkannte, besondere Organe, wie die Chlorophyllkörner und Stärkebildner, in denen sich die Structur des allgemeinen Cytoplasmas mehr oder weniger deutlich wiederholt, auszuschliessen.

1) Homogenes Protoplasma, das selbst bei sorgfältigster Untersuchung keinerlei Structur erkennen lässt, findet sich stets an der Oberfläche des Protoplasmakörpers, wo diese mit dem umgebenden Wasser unmittelbar sich berührt. So überzieht das körnerfreie, ganz homogene Hyaloplasma, bald in sehr zarter, bald in dickerer Schicht die Plasmodien der Myxomyceten, an deren künstlich durchschnittenen Aestchen aus dem freigelegten Körnerplasma eine neue, homogene Hautschicht entsteht (vergl. PFEFFER, II, p. 194, STRASBURGER, IX). Nach PFEFFER ist dieses homogene Protoplasma durch den ganzen Körper des Plasmodiums gewissermaassen als Grundsubstanz verbreitet und wird erst durch irgend welche, es trübende Einlagerungen, wie Oeltropfen, kleine Vacuolen, Mikrosomen zum Körnerplasma. Dieselbe Erscheinung, vollkommene Homogenität, bieten auch die Pseudopodien der Rhizopoden dar, also wiederum dort, wo das umgebende Wasser auf die protoplasmatischen Fortsätze und feinsten Ausläufer einwirkt. Hier vermochte BÜTSCHLI (III, p. 169—172) gelegentlich keine Waben mehr zu erkennen, er nimmt an, dass diese sich erweitert haben mit „gleichzeitiger und nothwendiger Verdünnung der Wände bis zu solcher Feinheit, dass sie nicht mehr sichtbar sind". Das heisst doch mit anderen Worten, die Verflüssigung des Protoplasmas hat an seiner Oberfläche zugenommen.

Ganz allgemein hat bereits im Jahre 1854 PRINGSHEIM (I, p. 8) mit dem Namen der Hautschicht jenen homogenen, körnchenfreien Saum bezeichnet, der alles Protoplasma, auch das in Zellwände eingeschlossene, nach aussen abgrenzt. PRINGSHEIM betrachtet diese Hautschicht (I, p. 15) als eine structurlose, leicht zusammenfliessende, klebrige Masse und stellt ihr das Körnerplasma, das ebenfalls zähflüssig ist, aber durch Körner getrübt, gegenüber. Da die Zellwände der Pflanzen stets mit Wasser imbibirt sind, so steht damit also auch hier das Cytoplasma ebenso gut in Berührung, wie bei den frei lebenden Amöben und Plasmodien u. s. w. Daher kann die gleichartige Ausbildung der homogenen Hautschicht nicht überraschen. Ebenso wird deren allmähliche Entstehung an künstlich erzeugten Vacuolen im Plasmodium der Myxomyceten (PFEFFER, II, p. 214, 215) auf gleiche Ursachen wie die periphere Hautschicht sich zurückführen lassen. Denn PFEFFER (II, p. 215) bemerkte, dass eben aufgenommene Asparaginkrystalle noch von keiner Vacuolenhaut (= Hautschicht) umgeben waren, dass diese aber sich zu bilden begann, als das Asparagin sich löste. Dadurch traten aber gewisse Theile des Innenplasmas mit einem Ueberschuss Wasser in unmittelbare Berührung, wie bei jeder Vacuolenbildung geschieht.

Erinnern wir uns noch daran, dass die Hautschicht stets ruhig ist, während das Körnerplasma oft lebhaft strömt (Plasmodien der Myxomyceten, Pflanzenzellen), so ergibt sich eine deutliche Poly-

morphie, neben die homogene, ruhende Hautschicht tritt das bewegte Körnerplasma.

Der Inhalt des ruhenden Zellkernes ist, wenn ausser dem Nucleolus und einigen anderen Körnchen nichts weiter zu erkennen ist, nicht in dem Sinne als homogen zu bezeichnen, wie oben die Hautschicht. Denn diese ist doch, trotz ihrer Homogenität, substanzreich und lässt sich entwicklungsgeschichtlich leicht auf das Körnerplasma zurückführen, während der formlose Inhalt der Kernhöhle als dünne, wässrige Flüssigkeit erscheint, deren Gehalt an gelösten Stoffen freilich dauerndem Wechsel unterworfen sein dürfte.

2) Granula aller Art und jeder Consistenz wird man in jeder lebenden Zelle finden, bald mehr, bald weniger. Die Nucleolen und die daneben noch zuweilen sich findenden Körnchen des Kernes würden ebenfalls hierher zu rechnen sein. Nicht minder gehören auch die Chromosomen zu den granulären Bildungen, obgleich ihre Gestalt von der kugeligen der gewöhnlichen Zellgranula abweicht. Diese letzteren können sehr verschiedener Art sein und durch ihre Häufung bald mehr, bald weniger den Bau des Cytoplasmas verändern. Besonders in den Drüsenzellen des thierischen Körpers, ebenso in vielen Leucocyten häufen sie sich so an, dass das Bild der lebenden Zelle grob granulirt ist und von dem intergranulären Cytoplasma kaum Spuren erkennen lässt. Ebenso sehen die Kleberzellen der Getreidekörner, die Cotyledonarzellen der Lupine und anderer, Proteinkörner enthaltender Samen aus. Gerade diese pflanzlichen Objecte geben ein von den Anatomen wohl nicht ausreichend gewürdigtes Beispiel ab für das Verständniss der granulaüberfüllten thierischen Drüsenzellen. Bei ihnen und bei den Reservestoffzellen der Pflanzen handelt es sich um die gleiche Erscheinung: um Einlagerung fester oder zähflüssiger, allmählich sich concentrirender Eiweisskörper, die als Reserve- oder Betriebsmaterial dienen sollen, in das Cytoplasma. Dieses wird dadurch grob wabig erweitert und umschliesst in einer besonderen Tasche oder Kammer jedes einzelne Korn, genau wie z. B. auch die Stärkekörner im Mais in solche Taschen eingebettet sind. Löst man die Stärke heraus, so bleibt das reiche Kammerwerk des Cytoplasmas zurück, wie es genau so zurückbleiben würde, wenn man aus den Drüsenzellen die Granulationen allein entfernen könnte. Stückweise lässt sich ja an entleerten Drüsenzellen diese Structur, freilich deutlich wohl nur nach der Fixirung, erkennen. Solche Drüsengranula gehören ebenso wie die Proteinkörner bereits zu den paraplasmatischen Bildungen und haben sicher nicht den Werth von Elementarorganen. Hierüber vergleiche man noch die kurze Besprechung der Granulalehre.

Scheidet man diese groben Körnchenablagerungen aus, so bleiben als beständige Beimengungen noch die sog. Mikrosomen übrig, die das Gefüge des Protoplasmas nicht wesentlich verändern und desshalb bei jeder beliebigen Grundstructur desselben vorkommen können.

Nur bedarf es noch einer näheren Angabe darüber, wo sie liegen. Bütschli (III, p. 158) nimmt an, dass sie nicht in den Wabenräumen,

sondern regelmässig in den Knotenpunkten des Wabenwerkes liegen, genau wie Mohnsamen in einen makroskopischen Schaum sich einlagern, von denen nur vereinzelte in die Lamellen sich verirren. Bütschli übersieht hier, dass er ein heterogenes Gemisch aus schaumbildender Masse und Fremdkörpern, eben den Mohnkörnern, vor sich hat und dass diese, als Wecker wirkend, nothwendig zu Ansatzpunkten für die Schaumlamellen werden müssen.

Die körnigen Einlagerungen des Plasmas, auch viele Mikrosomen sind doch aber sicherlich so entstanden, dass ihre Substanz zunächst gelöst in Vacuolen sich aussonderte und hier allmählich durch weitere Concentration ausfiel. So entstehen auch die Proteinkörner (vergl. Wakker, I, p. 5—7, Werminski, I). Demgemäss müssen solche Granula in den Wabenhöhlen, die sie selbst erst geschaffen und erweitert haben, liegen. Und wenn anderseits in einem ganz körnchenfreien, aber wabigen Plasma plötzlich ein Stoff intra vitam granulär gefällt würde, ohne vorherige Vacuolenansammlung, so müsste er, falls er nur in den Wabenwänden enthalten gewesen wäre, doch auch in ihnen sich absetzen, nicht bloss in den Kanten. Es zeigt diese Betrachtung, wie sehr Bütschli durch die Beobachtung an künstlichen Schäumen sich dazu verleiten lässt, das natürliche Protoplasma zu schematisiren. Besonders verlockend musste allerdings die Erfahrung an den Schäumen hier wirken, weil auch die Anhänger der Gerüsttheorie immer hervorgehoben hatten, dass die Körnchen in den Knotenpunkten des Netzes lägen resp. überhaupt weiter nichts seien, als diese Knotenpunkte. Da Bütschli alle Gerüststructur als verkannte Waben erklärt, so folgte das Weitere von selbst.

Wenn auch nicht geleugnet werden kann, dass im Gerüst (vergl. später die Eiweisskörper) die Knotenpunkte granulär sich abheben, so ist doch besonders noch zu betonen, dass es zweifellose, isolirte Körnchen im Protoplasma gibt, denen jede Theorie einen schicklichen Platz anweisen muss. Findet die Gerüstlehre, dass die Körnchen stets und ausschliesslich in den Knotenpunkten liegen, so muss das den Verdacht steigern, dass die Gerüste Artefacte sind. Denn wenn Körnchen bereits in einer Lösung suspendirt sind und diese wird ausgefällt, so müssen sich zuerst die Fällungen an die auch hier als Wecker wirkenden Körnchen ansetzen. In der That sind ja die feineren Beobachtungen über die Gerüststructur durchweg an fixirtem Material angestellt worden. Es wird sich später ergeben, dass in der lebenden Zelle wohl nur bei herabgemindertem Stoffwechsel zusammenhängende Gerüste entstehen können.

3) Gerüste und einzelne Fäden. Im ruhenden lebenden Kerne hat Flemming (IX, p. 10, VII, p. 308, 312, 314, V, p. 697, 698) bald deutliche Gerüste gesehen, bald nur schwache, blasse Andeutungen, bald nichts. Stets traten solche Kerngerüste durch Fixirung scharf und allgemein hervor, was Flemming mit einigem Widerstreben als eine Verdeutlichung ursprünglicher, nur zu blasser Structuren anerkennt, obgleich doch hier es sicher ist, dass Fällungsartefacte vorliegen konnten. Im Jahre 1877 war Flemming (V, p. 701) noch der Ansicht, dass „die Gerüste nicht in jedem Kerne und nicht in jedem gegebenen Moment überall die gleiche Beschaffenheit haben

werden, sondern dass sie etwas Physiologisch-wechselndes" sind. Jetzt neigt er wohl mehr dazu, eine fädige Grundstructur anzunehmen, die bald zu Gerüsten sich zusammenschliesst, bald aus isolirten Fädchen (Filarstructur) besteht.

Die Knäuelform des Kernes ist nach FLEMMING (VII, p. 363—368, 374) an lebendem Material nicht als ein in sich verlaufendes, geschlossenes Gerüst- und Knäuelwerk zu erkennen, auch PEREMESCHKO (I) und Andere waren nicht im Stande, dasselbe Bild, was die fixirte Zelle zeigt, bereits an der lebenden zu entziffern. Ich selbst habe an Tradescantiahaaren jenes Stadium, das den Knäuel liefern würde, öfter besehen, ohne Klarheit zu erlangen. Diese Frage kann hier unerledigt bleiben, denn mag nun der Knäuel offen oder geschlossen sein, eine polymorphe Uebergangsstufe ist er jedenfalls.

Genau wie die Kerngerüste sind auch die oft beschriebenen cytoplasmatischen Gerüste dem Verdachte, dass es Fixirungsfällungen seien, ausgesetzt (SCHWARZ, I, p. 131, BERTHOLD, I. p. 62). FLEMMING (I, p. 21, 26. 31, 39) hat mehrfach im lebenden Cytoplasma einzelne Fäden beobachtet, aber doch meistens nur verwaschen und nicht sich zu einem sichtbaren Netze vereinigend.

Nach diesen Beispielen, denen noch viele sich anschliessen, kann es also keinem Zweifel unterliegen, dass in einem der Hauptmasse nach flüssig und structurlos erscheinenden Plasma und Kern einzelne Fädchen und auch Gerüstgruppirungen ursprünglich vorkommen. Daneben die bereits besprochenen Strahlungen.

4) Schaumstructuren. Im Jahre 1851 sagte MOHL (I, p. 44), der Vater des Protoplasmas, nachdem er an dessen Zähflüssigkeit erinnert und die Vacuolisirung saftreichen Protoplasmas geschildert hat: „es verhält sich das Protoplasma zum Zellsaft, wie eine schäumende Flüssigkeit zu Luft". Oft genug seitdem kehrt die Bezeichnung schaumig oder vacuolig für gewisse Zustände des Protoplasmas wieder, die man (wohl nicht immer in vollem Bewusstsein dessen, was man sagte), gelegentlich auch netzig oder gerüstig nannte. Durch diesen Missbrauch wurde der wahre Sachverhalt, dass wirklich neben schaumigem Bau auch rein gerüstiger vorkommen kann, verdeckt und BÜTSCHLI's Verallgemeinerung vorgearbeitet, der, wie allbekannt, jedem Protoplasma Schaumstructur zuschreibt, auch wenn der erste Blick Gerüste zeigt. Ja, BÜTSCHLI meint, dass durch missbräuchliche Vernachlässigung der Blendung und der Beobachtung in Wasser liegender Objecte man die wahre Wabennatur des Protoplasmas allgemein verkannt habe. Näher auf BÜTSCHLI's Theorie geht der nächste Abschnitt ein; vorläufig genügt es, gezeigt zu haben, dass schaumige Structuren sicher weit verbreitet sind, z. B. in den reservestoffhaltigen Zellen der Pflanzen, in den thierischen Drüsenzellen.

5) Gemischte und wechselnde Structuren. Das überzeugendste Beispiel hierfür ist die Kern- und Zelltheilung mit ihren Strahlungserscheinungen, ihrer Ausformung der Chromosomen und der Rückbildung zu den ruhenden Tochterkernen. Auch in lebenden Kernen, die keinerlei Anzeigen einer bevorstehenden oder eben vollzogenen Theilung erkennen lassen, wurden sehr oft neben isolirten Körnchen auch fädige und gerüstige Bildungen beobachtet; z. B. fand ARNOLD (I, p. 246) in den Kernen lebender Leucocyten Fädchen und Körnchen, deren Verschie-

bungen und Lageveränderungen sich verfolgen liessen. Zeitweise verschwanden diese Bildungen, um wieder aufzutauchen. Für Opalina ranarum beschreibt NUSSBAUM (I, p. 489) Kerne mit feinkörnigem und fadenförmigem Inhalt. KRASSER (I, p. 578) sah in den Kernen von Phajus Körnchen in der Peripherie, weitmaschiges Gerüst, dem die Nucleolen und auch grosse Chromatinkörner eingebettet waren, im Inneren. In den Spinndrüsen der Raupen wechselt nach KORSCHELT (III, p. 85, Taf. VI, Fig. 178, 180) sogar in den einzelnen Theilstücken der sonderbar gelappten Kerne die Structur, ein Lappen war netzig, ein anderer granulirt, ein anderer erschien leer und dergleichen. Später wiederholt KORSCHELT (I, p. 506) diese Schilderung und bemerkt (I, p. 519), dass auch am fixirten Kerne die gleiche wechselnde Structur sich erhalten hatte.

An lebenden Knorpelzellen (Batrachierlarven), deren Theilung er verfolgte, sah SCHLEICHER (I, p. 256, 258 etc.) sowohl im Cytoplasma als in den Kernen: Körnchen, Fäden, Fädchen. Ein wirkliches Netzwerk war aber nicht zu erkennen, dessen Entstehung durch Reagentien, vielleicht schon durch Zusammenschmelzung der bereits vorhandenen Körnchen und Fädchen er für wahrscheinlich hält (I, p. 260) und desshalb nur die lebende Zelle zum Studium der feineren Structurverhältnisse verwendet wissen möchte. Ebensolche Mischstructuren der lebenden Zell- und Kernsubstanz sah PEREMESCHKO, z. B. (I, p. 440) im ruhenden Kerne „theils runde, theils verlängerte Körner, zwischen welchen hie und da einige kurze Fädchen liegen (Taf. XIX, Fig. 34), die zuweilen sich unter einander netzartig verbinden". Auch aus den oft citirten Arbeiten FLEMMING's würden sich Beispiele zusammenstellen lassen. Ich habe vorwiegend thierische Objecte erwähnt, weil diese seltener lebend beobachtet worden sind und jetzt überhaupt wohl alle erst durch Paraffin wandern, bevor sie untersucht werden. Die Botaniker brauche ich wohl nur daran zu erinnern, wie oft im lebenden Protoplasma und Zellkern Mischstructuren zu sehen sind. So wird es begreiflich, dass ein Botaniker (BERTHOLD, I) zur Aufstellung der Emulsionstheorie Muth und Material leicht finden und damit auch die Polymorphie des Protoplasmas gewissermaassen erklären konnte. Die Betrachtung lebender Pflanzenzellen und ihrer Desorganisationserscheinungen überzeugte auch KLEMM (I, p. 686) davon, dass „das Protoplasma nicht eine Masse von unveränderlicher, sichtbarer Structur" ist. „Reticulär, fibrillär, alveolär sind nur Zustände, die von ein und demselben Plasma, vorübergehend oder dauernd, im Leben oder auch erst beim Absterben angenommen werden können."

An diesen, die Ansicht der Pflanzenphysiologen wiedergebenden Satz erinnert auch der Ausspruch des Anatomen REINKE (II, p. 273), dass die Structur des Protoplasmas am treffendsten als gemischt aus Körnern und Fäden, die zum Theil netzig, zum Theil wabig angeordnet seien, vorgestellt werden könnte. Auch HELD (II, p. 252—255) hat, ausgehend von der Structur der Nervenzellen, die Polymorphie des Protoplasmas erörtert und sie gegenüber den monomorphistischen Theorien vertheidigt.

Alle diese Zeugnisse, die leicht aus meinen Literaturnotizen eindrucksvoller gehäuft werden könnten, mögen den von Tag zu Tag sich mehrenden Anhängern der monomorphen Modetheorien vielleicht

einigen Zweifel verursachen. Um diese noch zu verstärken, bitte ich das nächste Kapitel zu beachten.

Kapitel II. Die Polymorphie der Eiweisskörper im Zustande der Fällung und Wiederlösung.

Die Versuche, protoplasmatische Structuren künstlich nachzuahmen, sind, wie schon p. 2 erwähnt wurde, zum Theil mit natürlichen Eiweisslösungen (Hühnereiweiss), zum Theil mit Lösungen chemischer Präparate angestellt worden und haben im Allgemeinen die Erwartung bestätigt, dass plamaähnliche Bilder sich hervorrufen lassen. Alle diese Versuche (p. 2 u. 3) beschäftigten sich aber nur mit einem, auch in der lebenden Zelle zu vermuthenden Vorgange, der Fällung der Eiweisskörper, und benutzten hierzu ausschliesslich stark fällende Fixirungsmittel. Sanfter wirkende Lösungen aber, deren mildere Fällungskraft am ehesten den Vorgängen in der Zelle entsprechen würde, hat man nicht verwendet. Der entgegengesetzte Vorgang, die Lösung bereits gefällter Substanzen und die dabei erscheinenden protoplasmaähnlichen Bilder, sind an Eiweisskörpern noch nicht studirt worden. Man wird voraussagen können, dass der verschiedene Grad der Löslichkeit in einem gewissen Lösungsmittel auch verschiedene Lösungsbilder hervorrufen wird. Ferner war der Versuch zu machen, zähflüssige Bildungen aus Eiweisskörpern zu erzeugen und sie secundär zu fixiren, um zu ermitteln, wie weit solche Gebilde, deren Aggregatszustand dem vieler Zellelemente, z. B. der Chromosomen etc., entsprechen dürfte, sich naturgetreu erhalten lassen.

Alle diese Fragen hätten nur schwer behandelt werden können, wenn man freie Fällungen hätte verwenden müssen, sie lassen sich aber spielend mit Hilfe des Hollundermarkes erledigen, über dessen Imprägnirung mit Eiweisslösungen man p. 206 nachlesen wolle.

Um diese neuen Versuche zu legitimiren, wird es nur weniger Worte bedürfen. Dass Eiweisskörper der verschiedensten Art im Cytoplasma und Kern vorkommen, ist ja ausreichend bekannt, dass sie hier auch gelöst sind und vorübergehend ausgefällt werden, um später vielleicht wieder sich zu lösen, wird man zugeben. Man wird vielleicht einwenden, dass durch Zusammenschütten von noch so vielen Eiweisslösungen man niemals Protoplasma erzeugen könne und dass auch niemals der neue Pygmaleon erscheinen werde, der ein solches Gemenge beleben könne. Das scheint sehr klug, ist aber doch wohl selbstverständlich.

Wenn einmal nachgewiesen ist, dass Eiweisskörper, die den von der Chemie aus Organismen isolirten sicher ähnlich sind, in der lebenden Zelle allgemein und in grossen Mengen vorkommen, so ist man auch berechtigt, gewisse protoplasmatische Structuren, welche man künstlich mit solchen Eiweisskörpern erzeugen kann, mit den natürlichen Objecten zu vergleichen und zur Erklärung dieser heranzuziehen. Wenn also der Nachweis gelänge, dass die Eiweisskörper polymorphe Fällungs- und Lösungsbilder geben, so wäre damit die Polymorphie des Protoplasmas zwar

vielleicht ihres geheimnissvollen Schleiers entkleidet, aber doch auch dem Verständniss näher gerückt.

Dem ersten Beispiel für die Polymorphie der Eiweissfällungen, das zur Unterscheidung der Granula- und Gerinnselbildner veranlasste, ist bereits in dem Abschnitt über die Strahlungen noch ein zweites hinzugefügt worden. Es bleibt daher nur noch übrig, Gerüst- und Schaumstructuren zu erzeugen und die Bedingungen ihrer Entstehung zu ermitteln. Daran hätten sich endlich die Mischstructuren zu schliessen.

Gefärbte Dauerpräparate lassen sich von allen diesen, an und für sich gut haltbaren Structuren desshalb nicht herstellen, weil die Zellmembranen des Hollundermarkes sich stets sehr intensiv mitfärben. Wollte man aber sehr dünne Schnitte nehmen, in denen störende Zellwände oben und unten weggeschnitten sind, so leidet das Gesammtbild, das gerade in den Raum einer ganzen Markzelle sich eingepasst hat, ausserordentlich. Die Strahlungen zerbröckeln, und auch andere, gerüstige oder wabige Aggregate werden verunstaltet. Die Hollundermarkzelle ist sehr gross (p. 206), viel grösser als die meisten Zellen, in denen die feinen Plasmavorgänge für gewöhnlich studirt werden. Dieser Umstand erleichtert zwar einerseits die Versuche, anderseits aber erschwert er die Herstellung der Dauerpräparate. Um diese zu erhalten, empfehle ich, wie bei den Strahlungen, allmähliche Ueberführung in Glycerin und Einschluss der ungefärbten Markschnitte in Glyceringelatine. Hier halten sich die künstlichen Structuren jahrelang und bleiben auch so elegant, dass sie demonstrirt werden können.

1. Granula und Gerüste.

Die früher als Typus eines Granulabildners behandelte Albumose wird im Hollundermark von den meisten Fixirungsmitteln zunächst strahlig ausgefällt und scheidet sich dann zwischen den fädigen Strahlen auch granulös aus. Dabei wird man schon beobachten können, dass die Granula aus schwächeren, 3—5-proc. Lösungen klein bleiben, kleiner als bei freier Fällung im Reagenzrohr. Das ist leicht erklärlich. In der Markzelle ist doch ein bestimmtes, sehr kleines Quantum von Albumoselösung nur enthalten, das auch, sobald der Markschnitt in die fixirende Flüssigkeit gelegt worden ist, nicht mehr durch neues Zuströmen vermehrt wird. Das von allen Seiten herandiffundirende Fixirungsmittel ist also sehr bald im Uebergewicht und fällt die gesammte Albumose, von der ein Theil bereits strahlig ausgeschieden wurde, nur noch in winzigen und kleinen Granulis, die sich endlich auch zu gerüstähnlichen Bildungen an einander legen. Man kann so mit einer Lösung und einem Fixirungsmittel dreierlei Structuren auf einen Schlag erzeugen: die zuerst entstandene schöne Strahlung um den Kernrest ist mit kleinen Granulis besetzt und eingebettet in ein gerüstiges Gerinnsel. Rechnen wir noch dazu, dass sich ein Bläschen aus Niederschlagsmembran, ähnlich einem Kern, bildet (Fig. 11 p. 214), so ist die Polymorphie der gefällten Albumose sogar eine vierfache. Um dieses zu erreichen, bedarf es einer eben sauren Reaction der Albumose. Würde man statt ALTMANN's Gemisch Platinchlorid nehmen, so würden die Granula doch durchweg grösser werden und auch oft isolirt bleiben. Hier ergibt sich je nach Reaction und

Fixirungsmittel eine solche Fülle mannigfachster Bildungen, dass eine Einzelbeschreibung nur ermüden könnte.

Wie die Albumose neigen auch die anderen Granulabildner (Hämoglobin, Nucleinsäure) im Hollundermark zu gerüstiger Abscheidung, der zunächst Strahlung vorausgeht, wenn die p. 219 entwickelten Beziehungen zwischen Reactionsgeschwindigkeit und Diffusionsconstante des Fixirungsmittels erfüllt sind. Später werden die Strahlen durch die Gerüste oft vollständig verdeckt, zuweilen scheinen sie aber noch durch. Die Gerüste des Hämoglobins und der Nucleinsäure sind ebenso gebaut und entstehen ebenso wie die der Gerinnselbildner. Der Vollständigkeit halber sei nur erwähnt, dass Hämoglobin (2-proc. in Wasser) prachtvolle Gerüste mit folgenden Fixirungsmitteln gab, Strahlungen daneben dort, wo ein (St) beigesetzt ist: Alkohol, Aceton, Jod-Jodkalium (St), Osmiumsäure (St), Platinchlorid (St), Sublimat 7-proc. (St), Kaliumbichromat (St), Formaldehyd (St), FLEMMING (St), HERMANN's Lösung (St), Chromsäure (St). Man sieht, dass nahezu alle Mittel zunächst Strahlungen erzeugten, die mehr oder weniger durch die folgenden Gerüste verdeckt werden. Ich zweifle keinen Augenblick, dass auch Alkohol und Aceton bei neuen Versuchen solche versteckte Strahlungen würden erkennen lassen.

Um von Hefenucleinsäure schöne zarte Strahlungen und sie bald umschliessende und durchsetzende Gerüste zu erhalten, empfiehlt sich 2-proc. Essigsäure gegenüber einer wässrigen Lösung; auch 10-proc. Essigsäure ist noch brauchbar, nur wirkt sie stürmischer. Prachtvolle Gerüste mit grobgekörnten Bälkchen aus Nucleinsäure geben 0,5-proc. Chromsäure, 1-proc. Platinchlorid, FLEMMING'sche und HERMANN'sche Lösung; ebenso, nur im Wasser augenblicklich sich wieder lösend: Alkohol, Aceton. Dass in allen diesen Gerüsten einzelne Strahlungen versteckt sind, die sich vielleicht sogar durch subtile Färbungsmethoden herausdifferenziren liessen, ist sicher anzunehmen. Alle Gerinnselbildner werden im Hollundermark (Serumalbumin, Globulin, Casein, Conglutin, Nuclein) von den Fixirungsmitteln in wundervollen Gerüsten abgeschieden, die gerüstigem Protoplasma täuschend ähnlich sehen. Nur wenige Beispiele. Nuclein (1 Proc. in 0,5 KOH) wurde so gefällt von 0,5- oder 2-proc. Essigsäure, von FLEMMING's Lösung, von 0,5-proc. Chromsäure oder 1-proc. Platinchlorid. Die beiden letzten hatten auch einige sehr schöne Strahlungen erzeugt, die in dem feinbalkigen Gerüst auch später gut sich abhoben. Serumalbin (2 Proc. in 0,2 KOH) wurde ebenso gefällt. Vollständige Strahlungen, die vom Kernrest bis zur Zellperipherie verlaufen, wird man, versteckt in dem Gerüstwerk, in jedem Markschnitt wenigstens einige finden. Ich erinnere hier auch an die schöne mitotische Figur, die FLEMMING'sche Lösung um zwei Kernreste gebildet hatte (Fig. 13 *c*, p. 222). Da hier die zwischen den Strahlen ausgefällten Globuliten sich vorwiegend nur zu kurzen Kettchen (Margariten) aber noch nicht zu zusammenhängenden Gerüsten vereinigt hatten, so waren die Strahlen sehr gut zu sehen. Wenn die Gerüste dichter werden, dann bleibt oft nur eine schwach strahlige Gruppirung in unmittelbarer Umgebung des Kernrestes übrig.

Alle diese Fällungen sind in kaltem und heissem Wasser unlöslich, man kann secundär Albumose imprägniren und neue Versuche, über die der 3. Absatz zu vergleichen ist, anstellen.

Während die schönen Gerüste, die von den Fixirungsmitteln hervorgerufen werden, die Kritik fixirter Präparate unterstützen, nähern sich die gerüstigen Fällungen durch schwache Alkalien oder Säuren viel mehr schon dem, was in der lebenden Zelle sich ereignen kann. Ein Versuch mit Casein, der ebenso mit Albumin oder Globulin gelingt, wird genügen, besonders da mit den anderen Eiweisskörpern bereits Strahlungen durch Neutralisation p. 215 beschrieben worden sind. Einen Hollundermarkschnitt, der mit 2 Proc. Casein (in 0,2 KOH) imprägnirt ist, bringe man in einer Spur der Caseinlösung auf den Objectträger und stelle mit der Oelimmersion ein. Dann lasse man 0,5- oder 1-proc. Essigsäure zufliessen und beschleunige durch Fliesspapier das Eindringen. Man wird sehen, dass die vordringende Essigsäure zunächst nur isolirte, zitternde Bröckelchen (Globuliten) ausfällt, die nicht rein kuglig sind, sondern knorrig, verbogen und dergleichen. Wenn aber dann das Präparat zur Ruhe kommt und die weitere Ausfällung langsam sich vollendet, so legen sich die einzelnen Körperchen zu den schönsten Gerüsten zusammen (Fig. 20 p. 289). Würde man dünnere Essigsäure nehmen, vielleicht nur 0,1- oder 0,2-proc., so würden der allgemeinen Fällung auch schöne Strahlungen vorausgehen. Bei längerem Liegen in der Essigsäure löst sich alles wieder, weil die ganze Fällung, wie schon p. 216 gezeigt wurde, nur von der Neutralisation des Lösungsmittels abhängt. Hätte man in Säure gelöst, so müsste man mit schwacher Lauge dieselbe Erscheinung hervorrufen können. Das gelingt in der That.

Statt des Caseines sei ein Beispiel mit Globulin besprochen, das zunächst in Kali gelöst und dann mit starker Essigsäure vorübergehend gefällt und wieder gelöst war. Fügt man jetzt z. B. 0,75 Proc. KOH hinzu, so entstehen prachtvolle Strahlen, eingebettet in protoplasmatische Gerüste, die aus zusammengelagerten kleinen Fällungsbröckelchen bestehen (Fig. 13 *b* p. 222). Wenn man bei diesen Neutralisationsfällungen gerade das rechte Verhältniss zwischen Säure und Base getroffen hat, dann sind auch sie beständig. Sie lösen sich aber stets im Ueberschuss des Neutralisirungsmittels. Um die schönen Bilder festzuhalten, kann man, die histologische Fixirung vollständig nachahmend, Platinchlorid oder Chromsäure oder ein geeignetes anderes Fixirungsmittel verwenden. Die Structur der einmal vorhandenen Fällung wird diesmal nicht verwischt oder verändert (Fig. 13 *b*, 20). Sehr wichtig ist die polymorphe Ausfällung zu Strahlen und Gerüsten desshalb, weil hier derselbe chemische Körper, schon durch einfache Neutralisirung in zwei Gestalten erscheint, die auch in der sich theilenden Zelle oft genug beschrieben worden sind. Bekanntlich hat Strasburger (II, p. 60, IV, p. 375) hierauf eine functionell-morphologische Unterscheidung des Cytoplasmas in das strahlig-fädige Kinoplasma und das wabige Trophoplasma begründet. Im unthätigen Zustande soll das Kinoplasma (Strasburger, IV, p, 375) ebenfalls wabig sein und vom anderen nicht zu unterscheiden. Setzt man statt wabig gerüstig, so ist die Parallele vollständig. Der Nachweis, dass dieselbe Substanz strahlig-kinoplasmatisch und gerüstig gefällt wird, dürfte wohl zeigen, auf wie schwachen Füssen das Kinoplasma sich bewegt.

Der feinere Bau der Gerüste ist ganz derselbe, gleich-

viel, ob durch Fixirungsmittel oder durch Neutralisation gefällt wurde, gleichviel ob Nucleinsäure, Hämoglobin (Fig. 12) oder Globulin (Fig. 13 *b*), Albumin oder Casein (Fig. 20) oder Nuclein das Material lieferten. Nur würde eine gröbere oder feinere Punktirung der Gerüstbälkchen, eine schwankende Maschenweite als unbedeutende Differenz sich bemerkbar machen, theils abhängig von der Art des benutzten Eiweisskörpers, theils von der Concentration und dem Fixirungsmittel. Immer wird man aber die oben geschilderte Entstehung aus zunächst isolirten Elementen feststellen können und auf das deutlichste sehen, dass wirkliche Gerüste und keine Waben, kein Schaum entsteht. Durch Fällung kann Schaumstructur niemals erzeugt werden. Die künstlichen Gerüste stimmen mit der Beschreibung der plasmatischen durchaus überein. Senkrecht zum Gesichtsfeld stehende Bälkchen erscheinen als Granula, ebenso mehr oder weniger die Knotenpunkte, endlich sind die Maschen oft recht gleichmässig weit. Auf diesen letzten Umstand ist desshalb noch besonders hinzuweisen, weil FLEMMING (V, p. 705) gerade in der Regelmässigkeit der Maschenweite einen Beleg dafür erblickt, dass die Netze fixirter Kerne keine Artefacte, sondern ursprüngliche, nur verdeutlichte Structuren sein können. Die Maschenweite der künstlichen Gerüste hängt ab von der Concentration der Eiweisslösung, je stärker diese, um so enger sind im allgemeinen die Netze. Man vergleiche hierzu auch die Besprechung der Wabentheorie.

Beachtet man die Entstehung der Gerüste, so wird sich daraus auch erklären, warum im strömenden Plasma trotz seines Körnerreichthums niemals wirkliche Gerüste beobachtet worden sind. Grundbedingung der Gerüstbildung ist möglichste Ruhe, damit die bereits sich berührenden Fällungsbröckelchen auch aneinander hängen bleiben und so die ersten Anfänge der Gerüste sich erhalten. Da nun im strömenden Protoplasma die Körnchen unablässig verschoben werden, so können sie sich auch nicht gerüstartig zusammenlagern. Im ruhenden Kern aber oder an anderen Stellen, wo die Lebensprocesse ohne sichtbare Verschiebungen im Protoplasma sich abzuspielen scheinen, wäre, wenn reichliche Körnchen in die flüssigere Grundmasse eingestreut sind, auch eine Gerüstbildung möglich, zeitweise sogar unausbleiblich.

2. Schaumstructuren.

Die von BÜTSCHLI erzeugten mikroskopischen Schäume sind, wie alle Schäume, Entmischungszustände und können daher nur eine Seite der im Protoplasma sich abspielenden Vorgänge, die in einer „Structur“ sich verrathen könnten, veranschaulichen. Sobald es sich um Ausfällungen, also um die Bildung fester, im Protoplasma unlöslicher Verbindungen handelt, kann dieses nicht schaumig werden, sondern muss sich mit granulären oder gerüstigen Beimengungen erfüllen.

BÜTSCHLI (III, p. 216) schreibt auch dem geronnenen Hühnereiweiss und geronnener Gelatine einen durchweg wabigen Bau zu und hat in einer 1898 erschienenen Arbeit (IV) seiner Wabenlehre noch

weitere Ausdehnung zu geben versucht. Da ich hierauf, soweit es mein Gegenstand verlangt, in einem späteren Abschnitt werde eingehen müssen, so ziehe ich es vor, zunächst meine Beobachtungen und meine Anschauungen ohne Bezugnahme auf Bütschli's Ansichten mitzutheilen.

Um Schaumstructuren aus Eiweisskörpern zu erzeugen, muss man diese erst fällen und dann mit einem langsam wirkenden Lösungsmittel wieder lösen. Am bequemsten ist folgender Versuch. Man injicire Prismen und Schnitte von Hollundermark mit 10-proc. Albumose und fälle diese mit Alkohol (96-proc.), der bekanntlich die Albumose nicht coagulirt, so dass die neue Fällung nach wie vor in kaltem Wasser langsam sich löst. Untersucht man die Prismen in Alkohol, so wird man sehen, dass die Albumose als ganz homogene, glasige Masse ausgefällt ist, die, ohne granuläre oder gerinnselige Gestalt anzunehmen, die Markzellen gleichmässig erfüllt. In dickeren Schnitten, die immer noch der Oelimmersion bequem zugänglich sind, hat sich dagegen die Albumose in prachtvollen Riesengranulis und knorrigen, an grobe und plumpe Chromosomen erinnernden Körperchen ausgeschieden (Fig. 19 *c*), die bald mehr kuglig, bald gestreckt sind und selbst solche Umbiegungen, die auf gewissen Stadien der Mitose die Chromosomen zeigen, nicht vermissen lassen. Dünnere Schnitte, zu denen der fällende Alkohol schneller hinzutreten konnte, sind mit kleinen Granulis und gerinnseligen Aggregaten davon erfüllt. Ebenso wie die glasigen Massen in den Prismen, sind auch die groben und feinen Granula vollkommen homogen.

Wir legen einen dickeren, mit Alkohol behandelten Markschnitt in etwas Alkohol und stellen eine unverletzte Zelle ein, die dicht mit den groben, glänzenden, homogenen Körperchen und Granulis erfüllt ist (Fig. 19 *c*). Nun lassen wir Wasser zufliessen, nicht zu stürmisch, damit kein Zwischenglied des Vorganges uns entgeht. Sobald der Alkohol durch das Wasser verdünnt und dadurch zu einem, wenn auch schlechten Lösungsmittel für Albumose wird, beginnen die Granula zu quellen (Fig. 19 *d*) und können schliesslich zu einer vollkommen homogenen Masse zusammenfliessen, in der die einzelnen Grenzen der verschmolzenen Individuen ganz verwischt sind. Bei langsamerer Wirkung bleiben die Umrisse erhalten. Plötzlich erscheinen lauter winzige Vacuolen (Fig. 19 *e*), die soeben noch homogenen Massen oder gequollenen Körner sehen aus, als ob sie mit äusserst feinen Nadeln durchstochen worden wären. Bald rückt diese Vacuolisirung langsamer von der Zustromseite des Wassers vor, bald tauchen die winzigen Vacuolen gleichzeitig überall auf. Diese Unterschiede beruhen auf dem ungleichen Wasserzutritt. Schneller als diese Beschreibung sich liest, hat sich das Bild abermals verändert. Die winzigen Vacuolen dehnen sich aus und in 1—2 Minuten, vom ersten Wasserzusatz ab gerechnet, haben sich die groben Granula in ein prachtvolles Wabenwerk verwandelt (Fig. 19 *f*), das ein Zellnetz en miniature darstellt. Dringt das Wasser langsam heran, so verzögert sich, wie selbstverständlich, auch die Wabenbildung. Um sie etwas zu verlangsamen, empfiehlt es sich, statt Wasser eine Lösung von 0,1-proc. Sublimat in 25-proc. Alkohol zu nehmen, wodurch die schönen Wabenbilder gleichzeitig fixirt werden. Denn in

reinem Wasser löst sich schliesslich alles auf und warmes Wasser (ca. 60°) löst ohne Vacuolisirung, die Granula schmelzen einfach weg. Will man die Granula unverändert fixiren, so muss man alle wässrigen Lösungen vermeiden, selbst Sublimat, das doch in Alkohol leicht sich löst, versagt in concentrirter wässriger Lösung; es entstehen theilweise die schönsten Waben. Dagegen conservirt 2-proc. Sublimat in 96-proc. Alkohol sowohl die granulären Ausfällungen in den Schnitten, als auch die glasigen in den Prismen. In Wasser bleibt jetzt alles unverändert.

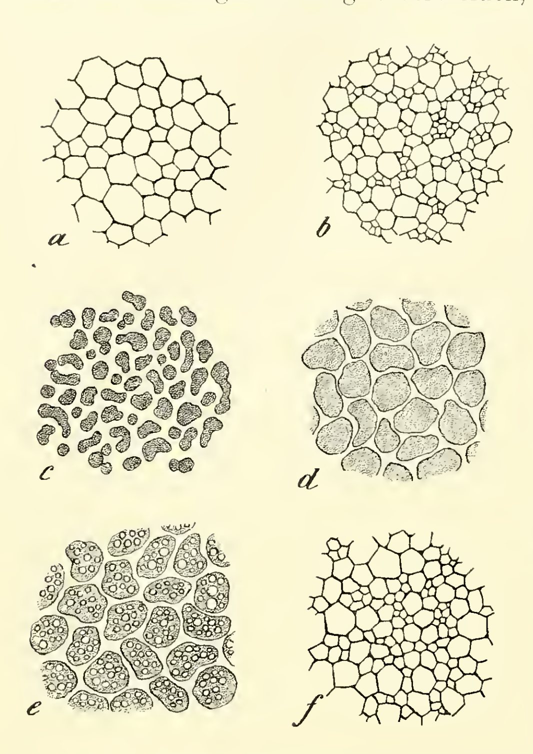


Fig. 19. Künstliche Schaumstructuren (Lösungsbilder) aus alkoholischer, wasserlöslich gebliebener Fällung von 10-proc. Deuteroalbumose, die in Hollundermark injicirt war. *a* und *b* FLEMMING'sche Lösung hatte auf ganze mit der Albumose injicirte Prismen des Markes, die vorher in Alkohol gelegen hatten und aus diesem unmittelbar in die Fixirungsflüssigkeit gebracht worden waren, 20 Std. eingewirkt. Statt der glasigen, ganz homogenen Masse der durch Alkohol gefällten Albumose, erfüllt ein bald weites und gleichmässiges (Fig. *a*), bald ungleiches (Fig. *b*) maschiges Wabenwerk die Zellen. Schon nach 10—15 Minuten ist diese Umwandlung beendet. (Vergr. 600.) Fig. *c—f*. Ebensolche Wabenbildung mit 0,1-proc. Sublimat in 25-proc. Alkohol (vergl. p. 283). Es waren aus dem mit Albumose injicirten Mark dickere, aber noch für Oelimmersion brauchbare Schnitte hergestellt und in 96-proc. Alkohol eingelegt worden. Die Albumose war granulär, knorrig u. s. w. gefällt worden (Fig. *c*), schon 1—2 Minuten nach dem Zusatz der alkoholischen Sublimatlösung zu dem in Alkohol liegenden Schnitt quellen die Albumosekörner (Fig. *d*) und werden sehr schnell fein nadelstichig vacuolig (Fig. *e*), um endlich zu dem Maschenwerk der Fig. *f*, das nunmehr sich unverändert erhält, sich zusammenzuschliessen. Nach Skizzen und frischen, die Veränderung zeigenden Präparaten gezeichnet; statt der infolge der Reproduction unvermeidlichen feinen Punktirung sind die Körner in Fig. *c—e* homogen zu denken, in *c* sehr glänzend, im gequollenen Zustande matter. (Vergr. 600.)

Solche Fixirungsmittel, die zwar in Wasser, aber nicht in Alkohol sich lösen, müssen unausbleiblich Waben erzeugen, aber auch in Alkohol lösliche wirken so, wenn sie in Wasser gelöst sind, weil stets das Wasser dem Fixirungsmittel noch vorauseilt und den Alkohol verdünnt. So erhält man die prächtigsten Wabenstructuren durch Uebertragen von Schnitten und Prismen aus Alkohol in: 1-proc. Platinchlorid, 1-proc. Osmiumsäure, FLEMMING'sche Lösung (Fig. 19 *a* u. *b*), Chromsäure 0,5, 10-proc. Formaldehyd, wässriges Sublimat (0,1-, 1-, 7-proc.). Hier hat die Theorie der

Fixirung abermals anzuknüpfen. Solche Consistenz, wie die der Alkoholfällung der Albumose, ist gewiss bei protoplasmatischen Gebilden sehr verbreitet, ebenso die Eigenschaft, in Wasser sich schneller oder langsamer zu lösen. Die zerstörende, lösende Wirkung des Wassers auf lebende Kerne beschreibt z. B. FLEMMING (I, p. 110, Fig. E 2, p. 104).

Das in solchen durch Wasser homogenisirten Kernen mit Essigsäure hervorrufbare Netzwerk kann nur eine secundäre Fällung der durch Wasser gelösten Kernsubstanz sein. Auch FLEMMING (I, p. 110) erkennt an, dass „schon einige Aenderung der natürlichen Disposition annehmbar" ist. Hierzu vergleiche man auch F. SCHWARZ (I, p. 90), nach dem in mit Wasser gequollenen Kernen durch FLEMMING'sche Lösung ein feinkörniger Niederschlag entsteht, „der nicht mit der Structur frischer Kerne zu verwechseln ist". Derselbe Autor (I, p. 88) beobachtete, dass die Kerne, besonders in den Vegetationspunkten sich vollständig in Wasser lösen. Zu diesen allbekannten Erscheinungen tritt noch ergänzend die Beobachtung HENKING's über Fixirung mit heissem Wasser hinzu. Nach HENKING (III, p. 715) war im Protoplasma der Spermatocyten, das in FLEMMING'scher Lösung netzig-wabig sich erhielt, das grobe Maschenwerk einer feinkörnigen, vereinzelt vacuoligen Beschaffenheit gewichen, als mit heissem Wasser fixirt wurde. Keine dieser beiden Structuren wird der ursprünglichen, natürlichen entsprochen haben. Das schnell wirkende heisse Wasser hat ein reines Fällungsbild erzeugt, während FLEMMING's Lösung genau wie bei unserem Hollundermark eine schaumähnliche Structur hinterlassen hat. Die Ursache ist hier, wie bei jeder Fixirung mit wässrigen Lösungen, leicht einzusehen. So klein man auch das zu fixirende Object zurecht schneidet, immer wird das Wasser schneller in sein Inneres vordringen, als der fixirende Stoff selbst, der zunächst an der Peripherie festgehalten wird. Es muss also jeder Fixirung der inneren Schichten eine Wasserwirkung vorausgehen, die sich bis zur völligen Lösung etwa vorhandener geformter Structuren steigern kann oder auf verschiedenen Lösungsstadien (Vacuolisirung) durch das nachfolgende Fixans unterbrochen und fixirt wird. Hierauf ist sicher ein guter Theil der wabigen Bilder, die im fixirten Object beschrieben worden sind, zurückzuführen. Ihr Werth für die Erforschung der lebenden Structuren bemisst sich daraus von selbst und ist nicht höher, als der der schönen Wabenbilder, die wir in Hollundermark erblicken, das durch Alkohol gefällte Granula oder homogene Massen aus Albumose enthielt. Die wabigen Proteinkörner (Taf., Fig. 40, 41) gehören ebenfalls hierher.

Solange die Markschnitte in Alkohol liegen, sind die Granula mit diesem imbibirt, wobei es ganz gleichgiltig ist, ob wir einen unsichtbar wabigen oder einen micellaren Bau voraussetzen. Das herantretende Wasser, das die Granula zur homogenen Masse verquillt und verschmelzt, wird neben dem Alkohol imbibirt und mischt sich mit ihm, ihn verdünnend. Sobald diese Verdünnung so weit gediehen ist, dass die Albumose löslich wird, erscheinen die zahlreichen winzigen Vacuolen, die nun rasch sich erweitern, sobald neues Wasser herbeiströmt. So muss ein Zustand folgen mit sehr grossen, gelöste Albumose enthaltenden Vacuolen und zarten Wabenwänden aus dem ungelösten Rest. Tritt jetzt ein die

Albumose unlöslich fällender Stoff heran, so bleiben diese Wände stehen: das unverwüstliche Wabenwerk, das z. B. nach FLEMMING'scher Lösung (Fig. 19 *a* u. *b*) oder nach Platinchlorid auch kochendes Wasser verträgt, ist fertig. Die Wabenhöhlen füllen sich nicht mit secundären Niederschlägen, weil von der geringen Menge überhaupt vorhandener Albumose doch nur ein Theil in diesen Vacuolen sich löste. Vereinzelte, secundär gefällte Körnchen wird man stets finden können.

Statt in Hollundermark und mit Alkohol kann man auch im Reagenzglas mit 0,1-proc. Safranin oder Pikrinsäure die Albumose fällen, zu einer klebrigen, homogenen Masse, die nun ebenfalls durch Wasser sich prachtvoll vacuolisiren lässt. Hierbei wird man noch beobachten, dass die äusserste Zone der schaumigen Masse vollkommen homogen bleibt, so dass das Ebenblid eines Plasmodiums mit hyaliner Haut und körnigem (vacuoligem) Innern entsteht. Sogar pseudopodienähnliche Hervorbrüche sind zu finden. Endlich auch schwache Strömungen, die aber hier nicht weiter zu behandeln sind. Nur die homogene Peripherie, die man auch sehr schön an den Alkohol-Albumose-Versuchen sehen kann, verlangt eine Erklärung. Sobald das Wasser an die gefällte, durch Alkohol oder Safranin in Fällung erhaltene Albumose herantritt und einzudringen beginnt, beginnt auch eine umgekehrte Diffusion des Alkoholes oder des Safranines gegen das Wasser. In der Randzone der gefällten Masse werden sich also diese, die Lösung hindernden Stoffe zunächst concentriren, und desshalb bleibt der Rand anfangs homogen und erliegt, da die Lösung überhaupt nur langsam geschieht, auch sehr langsam erst der Vacuolisirung, denn etwa in das umgebende Wasser austretende Mengen werden immer wieder durch neuen Nachschub ergänzt.

An diese Beobachtung anknüpfend, mag es gestattet sein, hier eine Vermuthung darüber einzuschieben, wie es kommt, dass alles Protoplasma gegenüber dem umgebenden Wasser sich durch eine homogene Hautschicht (p. 273) abgrenzt. Wir setzen voraus, dass das Protoplasma zähflüssig ist und in diesem Zustande durch gewisse, Eiweisskörper lösende und fällende Salze, resp. Alkalien oder Säuren gehalten wird und dass in diese flüssige Grundmasse als Granula und Vacuolen theils feste, theils vollkommen flüssige Bestandtheile eingelagert sind. Mit kurzen Worten nehmen wir also an, dass das Körnerplasma der Plasmodien etc. die ureigene, von äusseren Agentien unbeeinflusste Erscheinungsform der lebenden Substanz ist, die durch Wasser, wie vielfach ja beobachtet, verflüssigt und gelöst wird. Sobald nun das Wasser an das Körnerplasma, z. B. an durchschnittenen Plasmodienästen, herantritt, beginnt eine solche Lösung, zunächst als Quellung, und verwandelt das Körnerplasma, ebenso wie oben die Albumosekörner, in eine homogene Randzone. Das vollständige Zerfliessen in Wasser wird aber dadurch verhindert, dass aus dem Körnerplasma gegen das heranfluthende Wasser jene Stoffe diffundiren, die den zähflüssigen Zustand im Innern bedingen. Durch diese Stoffe wird also die lösende Wirkung des Wassers bekämpft und theilweise überwunden, aber doch nur theilweise, und desshalb bleibt die Peripherie homogen und wird zur Hautschicht. Diese wird an der Oberfläche jedenfalls ununterbrochen durch Wasser gelöst, aber durch

immer neue Nachschübe von Körnerplasma, das wiederum dem Schicksal der homogenisirenden Verquellung verfällt, regenerirt. Je nachdem nun diese Wasserwirkung und die dagegen arbeitende Thätigkeit des Körnerplasmas sich verhalten, wird auch die Hautschicht bald dicker, bald dünner sein, bald langsam, bald mehr eruptionsartig sich erneuern.

Specieller auf diese Frage hier einzugehen, war nicht meine Absicht. Ich erinnere nur noch an einen Ausspruch von W. KÜHNE (II, p. 39). Er sagt: „Man wird den Einwand machen, dass nicht einzusehen sei, wie ein so kleiner Eiweisstropfen wie eine Amöbe so lange der allmählich fortschreitenden Diffusion zum Wasser widerstehe. Ich kann diesen Einwand nicht durch einen Versuch zurückweisen, da ich künstlich keinen Eiweisstropfen so geringer Dimension herstellen kann, der, in Wasser gesetzt, so lange flüssig bliebe. Allein die Amöbensubstanz ist zugleich fähig, Nahrung zu assimiliren und unbrauchbare Reste auszustossen. Sie regenerirt sich also, und das Constantbleiben der Körpersubstanz durch Aufnahme und Ausgabe ist es, was wir als Leben bezeichnen, diese Erhaltung äusseren Einflüssen gegenüber, dieser Kampf um das Dasein ist es, der zur Definition des Lebens gehört.“

Diese 1864 veröffentlichten Worte KÜHNE's sind vortrefflich geeignet, die oben entwickelte Anschauung über die Hautschicht (hyaline Schicht) zu befürworten. Noch auf einen Punkt ist hinzuweisen. PFEFFER (II, p. 248) ist der Ansicht, dass gelöstes Eiweiss an der äusseren Grenzfläche des Protoplasmas nicht vorhanden ist, und neigt, wie schon früher (III, p. 145) zu der Annahme, dass die Hautschicht und besonders die osmotisch entscheidende Plasmahaut aus gefällten Eiweisskörpern besteht, die gerade dadurch ausgeschieden würden, dass das umspülende Wasser das Lösungsmittel verdünnt. Diese dichtere Lagerung der Micelle in der Haut aus gefällten Protoplasmastoffen würde dann auch entscheidend ihre Filtrationseigenschaften bedingen. Da PFEFFER's Auffassung doch nur als hypothetisch sich darbietet, so kann ich meine Vermuthung ihr mit gleichem Recht gegenüberstellen und statt der Lagerung der Micelle auf eine andere Eigenschaft verweisen, welche, selbst bei stärkerer Verflüssigung, noch die Impermeabilität der Hautschicht für gewisse Stoffe erklären könnte. Ich meine das Adsorptionsvermögen der Eiweisskörper, das durch deren Fällung sogar sich steigern würde. Auf p. 159 wurde gezeigt, dass Granula aus Albumose und aus Nucleinsäure gewisse Stoffe, z. B. die Mineralsalze, sicher nur sehr wenig adsorbiren, während Anilinfarben bis zu tiefster Färbung adsorbirt werden. Die stark gequollene zähflüssige Hautschicht würde allgemein weniger, vielleicht viel weniger adsorbiren, als die festgefügten Granula, aber es würde das Adsorptionsvermögen für die verschiedenen Substanzen doch wahrscheinlich gleichsinnig abnehmen. Salze würden also mehr abgesperrt sein als Anilinfarben. Ich habe nicht die Absicht, ohne speciell darauf gerichtete Untersuchung, diese Frage hier speculativ auszumalen; es wird genügen, die Möglichkeit einer Erklärung kurz dargelegt zu haben.

Nach dieser Abschwenkung soll noch ein zweiter Versuch über Schaumstructur aus Eiweiss dessen Polymorphie veranschaulichen. Nicht glückt es, aus Nucleinsäure (2-proc.), die mit Alkohol fein granulär in Mark eingelagert war, Waben durch Wasser

zu erzeugen, weil dieses zu schnell löst und sofort alles wegschmilzt. Geeigneter sind die Gerinnselbildner, nur müssen hier, da Wasser nicht zur Lösung, Alkohol nicht zur Fällung brauchbar ist, wieder die Neutralisationsniederschläge benutzt werden. Bis jetzt liegt nur eine Versuchsreihe mit Casein vor, dem sich zweifellos Albumin, Globulin, Nuclein bei geeigneter Versuchsanstellung anschliessen. So elegante Waben, wie mit der alkoholischen Albumosefällung, entstehen hier nicht, weil die Löslichkeit des Caseingerinnsels nicht so günstig ist, wie dort. Die Wabenräume aus Casein sind sehr gross, die kleinsten von ihnen wohl immer noch weiter als die grössten aus Albumose. Auch lässt sich, weil alles sehr schnell sich verändert und einstweilen kein Mittel der Verlangsamung gesucht wurde, die Vacuolisirung nur bruchstückweise verfolgen. Dafür entschädigt aber das Casein dadurch, dass es die Lacunisirung oder Vacuolisirung einer gerüstigen Structur veranschaulicht, während wir oben von Granulis und homogenen Massen ausgingen.

Der neue Versuch ist folgender. Die mit 2-proc. Casein (in 0,2 Proc. KOH) injicirten Hollundermarkschnitte werden auf Fliesspapier abgetupft und in einen offenen Tropfen von 0,5-proc. Essigsäure gelegt, wo sofort, innerhalb der ersten 30 Secunden, nicht allein der gerüstige Niederschlag entsteht, sondern auch die groblöcherigen Vacuolen. Durch sofortiges Uebertragen in 1-proc. Platinchlorid oder 0,5-proc. Chromsäure lässt sich dieser sonderbare Zustand auch fixiren (Fig. 20). Man erkennt deutlich ein äusserst zierliches Gerüstwerk, das auch hier durch Aneinanderlagerung ursprünglich isolirter, granulär-bröckeliger Niederschlagstheilchen entsteht und infolge der ebenso schnell wie die Fällung sich einstellenden Lösung von Höhlungen (Vacuolen) verschiedener Grösse durchsetzt wird. Dass wirklich Vacuolen, allseits von einer dichten Gerüstlage umschlossene Hohlräume entstanden sind, lehrt ein Vergleich des Oberflächenbildes mit dem Querschnittsbild (Fig. 20*a*). Die Bälkchen des zierlichen Gerüstwerkes sind zu einer als Vacuolenhaut erscheinenden dichten Schicht zusammengeschoben (Fig. 20*c*), einfach dadurch, dass die Lösung an einigen Stellen im Innern der Gerüstmaschen begann, von hier aus sich weiter verbreitete und das Gerüst zusammendrängte, bis ein einstweiliger Abschluss durch die verdichtete Hüllzone hergestellt war. Alle diese Einzelheiten lassen sich nicht schrittweise verfolgen, weil der ganze Vorgang zu schnell verläuft.

Legt man auf den in wenig Casein liegenden Schnitt ein Deckglas auf, stellt ein und lässt vom Rande aus 0,5- oder auch 1-proc. Essigsäure zufliessen, so entsteht nur ein mit der allmählich vordringenden Essigsäure erscheinender Niederschlag aus tanzenden Bröckelchen, die sich sehr bald zu einem gleichmässigen, nicht vacuoligen Gerüst zusammenlegen (Fig. 20*a*, unterste Zelle). Oft erscheinen zuerst einige schöne Strahlungen. Auch wenn das Deckglas auf Fettfüsschen gestellt wird, um so eine schnellere Ueberfluthung des ganzen Schnittes mit Essigsäure zu ermöglichen, wird man zumeist doch nur das gleichmässige Gerüst entstehen sehen. Damit die Vacuolisirung blitzartig sich an die Fällung anschliesst,

ist es nöthig, dass der ganze Markschnitt gleichzeitig von allen Seiten von Essigsäure umspült wird, was nur durch schnelles Untertauchen im offenen Tropfen zu erreichen ist. Die Concentration der Essigsäure ist dabei sehr genau einzuhalten: 0,1-proc. gibt etwas langsamer, aber auch noch in $^1/_2$ Min. ganz vacuolenfreie, gleichmässige Gerüste, 0,2-proc. vacuolisirt nur sehr vereinzelt, noch besser wirkt 0,3-proc., und sicher ist als Optimum 0,5—1-proc. anzusehen. Schon 2-proc. ist zu stark, der zuerst schön strahlige, dann gerüstige, gleichmässige Niederschlag löst sich bald wieder, und 5-proc. erzeugt nur eine augenblickliche, an der milchigen Trübung der Schnitte er-

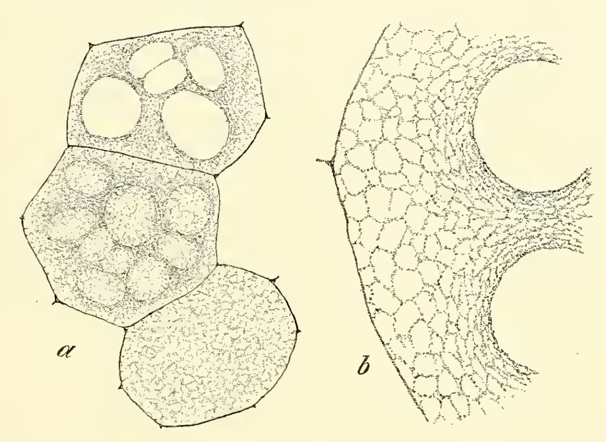


Fig. 20. Secundäre Vacuolisirung von Gerüststructuren. Casein 2-proc. in 0,2 KOH in Hollunderschnitten mit 0,5-proc. Essigsäure gefällt, wird zuerst schön weitmaschig gerüstig, aber infolge partieller Lösung groblöcherig, vacuolig, die Lamellen zwischen benachbarten Vacuolen und die Umsäumung dieser besteht aus zusammengepressten Gerüsten. *a* Drei Markzellen, neben einander, die untere das reine Gerüstwerk zeigend, die obere den Durchschnitt durch die groben Lacunen, die mittlere eine Aufsicht, um zu zeigen, dass die Löcher und Lacunen wirklich ringsum von der gerüstigen Caseinfällung umgeben sind. (Vergr. 175.) *b* Ein Stück bei sehr starker Vergrösserung; die weitmaschigen Gerüste, nicht Schaumstructuren, aus gefälltem Casein werden an der Peripherie der Lacunen enger, sie sind durch die sich ausdehnenden „Vacuolen" zusammengepresst, so dass eine Vacuolenhaut entstanden ist. Auch in dem Isthmus zwischen den beiden Lücken ist diese Wirkung deutlich zu sehen. (Vergr. 1500.)

kennbare Fällung, die aber schon wieder geschwunden ist, wenn man den Schnitt mikroskopisch betrachten will. Jetzt hat der Ueberschuss von Essigsäure die zunächst entstandene Neutralisationsfällung augenblicklich wieder gelöst, während schwächere Säure (0,5- und 1-proc.) doch etwas langsamer, zuerst nur stellenweise löst und dadurch vacuolisirt. Ist die Säure noch verdünnter (0,1- oder 0,2-proc.), so kann sie zwar das Alkali der Caseinlösung neutralisiren und die gerüstige Fällung hervorrufen, es fehlt aber weitere Säure, um zu lösen. Selbst wenn man davon noch mehr durchsaugt, erhält sich der Niederschlag, der aber in stärkerer, z. B. 5-proc., Essigsäure ebenso schnell verschwindet, wie durch 0,2-proc. Kali.

Diese ausserordentliche Labilität der Neutralisationsfällung des Caseines, dem sich Albumine und Globuline

anschliessen, ist wohl geeignet, manche Erscheinungen im Protoplasma, wo doch sicher der Gehalt an freier Säure oder Base sehr oft um die Neutralisationsgrenze herum schwankt, zu verstehen und vorauszusehen. Ein als protoplasmatische Structur erscheinender Niederschlag mag z. B. durch schwache Säuerung des ursprünglich alkalischen Zellinhaltes hervorgerufen worden sein. Der Niederschlag könnte verschwinden, wenn die Säure noch wüchse, er könnte aber auch vergehen, wenn die frühere Alkalescenz wiederhergestellt würde, wozu, wie im obigen Beispiel mit Casein, schon sehr verdünnte Säure und Alkali ausreichen würden. Die hierbei entstehenden labilen Fällungen würden polymorph in 4 Gestalten sein können: 1) isolirte, granulaähnliche Bröckelchen, 2) gleichmässige, engmaschige Gerüste, 3) grobvacuolige Gerüste mit engmaschigen Zwischenstücken und 4), wenn in der Zelle ein heterogener Körper als Wecker vorhanden ist, auch noch Strahlungen.

Dass die groben Vacuolen hier nicht aus elementaren Waben hervorgehen, lehrt die ganze vorstehende Beschreibung; aber auch die schönen Wabenwerke, die aus der alkoholischen Albumosefällung sich hervorbilden, sind nicht, wie Bütschli annehmen müsste, durch Ausdehnung bereits vorhandener, nur unsichtbarer Elementarwaben entstanden, sondern Neubildungen in der zunächst ganz homogenen, verquellenden Masse. Eine Neubildung, wie der Seifenschaum, der als Seifenwasser auch noch nicht wabig gebaut ist.

Ringgranula, mit stark färbbarer Peripherie von äusserst variabler Breite an den einzelnen Körnern und einem entsprechenden Loch im Innern, sind stets ein Zeichen dafür, dass eine partielle Lösung stattgefunden hat. So ist z. B. der Niederschlag der Albumose mit Gerbsäure in dem Ueberschuss nicht ganz unlöslich und infolgedessen herrschen Ringgranula vor. Behandelt man die granuläre Sublimatfällung der Albumose mit Jodalkohol, so verwandeln sich die zuerst allgemein entstandenen Vollgranula reichlich in Ringe, ebenfalls weil sie langsam gelöst werden. Die Fällung der Albumose mit Jodkaliumquecksilberjodid ist in Wasser nicht ganz unlöslich und daher in den gefärbten Präparaten mit prachtvollen Ringgranulis untermengt. Solcher Beispiele wird man sich zu erinnern haben, wenn in Präparaten Ringgranula auftauchen. Einen überraschenden Fall dieser Art bespricht Starke (I u. II), worüber man den Absatz über die Granulalehre vergleichen wolle.

Nichts weiter als ein Lösungsbild ist auch das Sichelstadium des Nucleolus, das Lidforss (I) neuerdings genauer untersucht hat. Wenn man Lupinensamen 24 Stunden in Wasser einquellt und nun die Keimwurzeln fixirt, so wird man in deren Basis die meisten Proteinkörner in den schönsten Sichelstadien finden (Taf., Fig. 42), deren Orientirung keine Beziehungen zu dem Eindringen des Fixirungsmittels erkennen lässt.

3. Gemischte Structuren und Protoplasma.

Auf welche Weise die Lösung ein und desselben Eiweisskörpers im Hollundermark zu gemischten Structuren ausgefällt werden kann,

ist schon in den vorigen beiden Abschnitten besprochen worden. Dass auch Gemische verschiedener Eiweisskörper polymorphe Gestalt annehmen müssen, folgt daraus ganz von selbst und wurde p. 217 auch noch für ein Gemisch von Serumalbumin oder Hämoglobin mit Albumose (Fig. 12, p. 217) besonders gezeigt. Endlich waren auch die freien Fällungen geeigneter Gemische (p. 53) polymorph, weil Granula- und Gerinnselbildner stets in der ihnen eigenen Fällungsform sich abscheiden. Solange man also das Protoplasma als eine, wenn auch zähflüssige, Flüssigkeit gelten lässt, solange entsteht keine Schwierigkeit, die in der lebenden oder fixirten Zelle auftretenden polymorphen Structuren mit den Eigenschaften der Eiweisskörper zu erklären. Ein Streit würde nur darüber sich entspinnen können, was davon in der fixirten Zelle als ursprünglich, was als artificiell aufzufassen wäre. Denn beides muss den gleichen Bau haben.

Der flüssige Aggregatszustand des gesammten Protoplasmas, nicht bloss seines einen mit Vorliebe als Enchylema bezeichneten Theiles, erschien den älteren Beobachtern, und besonders den Physiologen, geradezu als selbstverständlich. Man vergleiche nur, wie Kühne (II, p. 34, 35), Mohl (I, p. 44), Pringsheim (I, p. 5) und Andere sich hierüber äussern. Und selbst wenn man die Zähigkeit des flüssigen Zustandes besonders betont, so wird doch schliesslich die Haupteigenschaft, dass ein festerer Bau fehlt, anerkannt. Pfeffer (II, p. 254, 255) sagt, dass „die zähflüssige oder plastische Beschaffenheit in keinem Falle ein fest zusammengefügtes, dauernd starres Gerüste im Protoplasma zulässt“.

Bis zur Annahme eines solchen „dauernd starren Gerüstes“ versteigen sich auch die Zellmorphologen nicht, denn sie setzen doch Contractilität und Verschiebbarkeit des angenommenen Gerüstwerkes voraus. Denn dessen ist sich doch wohl jeder bewusst, dass so starre und unverrückbare Structuren, wie das fixirte Präparat enthält, in der lebenden Zelle nicht vorkommen. Stimmt man dieser Einschränkung zu, dann wird man aber auch der Annahme sich nicht verschliessen können, dass die im zähflüssigen Protoplasma enthaltenen Eiweisskörper gemäss ihrer Polymorphie im Zustande der Fällung und Wiederlösung solche Structuren in der lebenden Zelle in buntem Wechsel annehmen werden, wie man sie künstlich erzeugen kann.

Sollte aber doch Jemand voraussetzen, dass eine starre Elementarstructur schon während des Lebens besteht, so würde er noch die Frage einwerfen können, ob auf und zwischen eine solche, sicher monomorphe Structur noch neue, secundäre und polymorphe Structuren aus gelösten Bestandtheilen abgeschieden werden könnten. Diese monomorphen Theorien, die z. B. die Strahlung nur für eine Umlagerungserscheinung, nicht für eine totale Neubildung erklären, könnten verlangen, dass in ein festes, in Hollundermark eingesperrtes Gerüstwerk noch secundär Strahlen eingelagert würden.

Wenn man mit Serumalbumin und Platinchlorid oder Chromsäure schon Gerüste in Mark erzeugt und gut ausgewaschen hat, so kann man nun secundär eine Albumoselösung imprägniren. Es entstehen aber nunmehr mit Osmiumsäure oder anderen günstigen Strahlungserregern keine Strahlen, sondern die Albumose wird

interfilar körnig ausgefällt. Nur wenn das Gerüst sehr locker und weitmaschig ist, bilden sich einige Strahlen, und wenn zufällig die nächste Umgebung des Kernrestes leer geblieben ist, so setzen sich auch Strahlenanfänge an, die sich aber bald in dem Gerüste verlieren. Alles das ist nach p. 218, wo die Ursachen der Strahlung besprochen wurden, ganz unausbleiblich.

Ebensowenig gelingt es, in einem aus Alkoholalbumose und Platinchlorid erzeugten und secundär mit 10-proc. Albumose imprägnirten Wabenwerk Strahlung hervorzurufen, weil durch dieses genau wie durch die Gerüste die Grundbedingung für das Strahlungsphänomen, dass ein mehr oder weniger heterogener Körper als Wecker in der Lösung schwebe, aufgehoben ist. Denn jetzt stossen die hereindringenden Kugelwellen des Fixirungsmittels überall auf Gerüstbalken oder Wabenwände, die alle, sobald die Uebersättigung eintritt, als Fremdkörper wirken. So wird auch in und auf den Waben die Albumose nur granulär ausgefällt.

Es bleibt noch der Fall übrig, dass in einer, fällbare Stoffe enthaltenden Lösung isolirte Granula schweben, zwischen denen sich die Strahlung auszuscheiden hätte, vergleichbar der zwischen den Dotterkügelchen des thierischen Eies entstehenden. Mit 5-proc. Albumose imprägnirte und 1-proc. Platinchlorid ausgefällte Hollundermarkprismen erfüllen sich zwar mit isolirten Granulis, die aber zu schwer sind und fast alle auf die untere Wand der Markzelle herabsinken. Zwischen den wenigen, in der secundär imprägnirten Albumoselösung schwebenden Granulis scheidet angesäuerte Osmiumlösung ebenso schöne Strahlungen aus, wie in einer körnchenfreien Lösung. Nur ist die Menge der Körnchen, die auch in die Strahlen aufgenommen werden, zu gering, um ein volles Ebenbild der Eistrahlung zu geben. Jedoch darf man nicht vergessen, dass auch diese bald in dem dichteren Dotterplasma sich verliert und vermischt und immer dort am deutlichsten ist, wo die paraplasmatischen Dotterkügelchen fehlen. Meint doch sogar Drüner (II, p. 298), dass die Polstrahlen anfangs die Aufgabe haben sollen, „die Dotterkügelchen fortzuschieben und so den Raum für Metakinese und Anaphase frei zu machen“. Diese Deutung ist mit anderen Worten daraus abgeleitet, dass die Strahlung sich am deutlichsten in der dotterfreien Umgebung des Kernes entwickelt, was wieder sehr gut mit unserer Erklärung des Strahlungsphänomens sich verträgt. Nimmt man, um die Granula kleiner und schwebfähiger zu machen, nur 2-proc. Albumoselösung und fällt mit 0,1-proc. Platinchlorid, so vermindert sich ihre Zahl doch so, dass die Aehnlichkeit mit dem Ei verloren geht.

Es wurde noch versucht, in den Hollundermarkzellen feinkugelige Emulsionen von Oel oder Xylol einzulagern, was leicht auf folgende Weise gelingt. Man entwässert zunächst dickere Querschnitte aus Mark in absolutem Alkohol und legt sie nun auf 1—3 Tage in ein Gemisch aus 2-proc. Alkohol und 1-proc. Xylol, oder eine Lösung von 1 Tropfen Leinöl in 10 ccm Aether, oder 1 Tropfen Ricinusöl in 10 ccm Alkohol. Alle diese Lösungen dringen sehr gut ein. Bringt man nun die so imprägnirten Schnitte in Wasser, so entsteht in den Zellen eine Emulsion, untermischt mit schönen Entmischungsschäumen. Die Versuche weiter auszuführen, d. h. Albumose unter der Luftpumpe zu injiciren und nun durch Osmiumsäure Strahlungen hervorzurufen,

verbietet aber folgende Ueberlegung. Die Emulsionstropfen aus Oel oder Xylol sind unbenetzbar und können desshalb für die ausfallende, wasserimbibirte Albumose gar nicht als Ansatzpunkte dienen, weil diese nicht adhäriren kann. Desshalb würde ein Versuch, der die schönsten Strahlungen, unbeirrt von den Oeltropfen, erzeugt hätte, keinen Vergleich mit dem thierischen Ei gestatten, denn dort setzen sich die Strahlungen doch wirklich auch an die Dotterkügelchen an.

Alle bisherigen Versuche beziehen sich auf die Fremdstrahlung (p. 224); es bedarf noch die Selbststrahlung eines Wortes. Sie deckt sich ja in ihrer Wirkung auf etwa vorhandene, leicht verschiebbare Körnchen oder Structuren, viel mehr mit den jetzt herrschenden Vorstellungen, die z. B. im Centrosom ein Imbibitionscentrum vermuthen, das centrirend auf bereits vorhandene Waben einwirkt. Da alle solche und ähnliche Vorstellungen von der geläufigen Tagesmeinung bereits sanctionirt sind, so bedürfen sie hier keiner besonderen Vertheidigung.

Die Fremdstrahlung aber, als die hier zum ersten Male ein Theil der Zellstrahlungen aufgefasst wird, kann sich in starren Structuren nicht secundär ausbilden, sondern verlangt eine verhältnissmässig freie Bahn. Die zähflüssige, leicht verschiebbare Beschaffenheit des lebenden Protoplasmas ist sicher ein geeignetes Medium für die Fremdstrahlung.

Selbst wenn das Plasma die Consistenz einer erstarten 5-proc. Gelatine annehmen würde, würde die Fremdstrahlung ebenso schön und schnell sich ausbilden. Man imprägnire durch 1-stündiges Kochen im Dampfsterilisator eine 5-proc. Gelatine, die 5 Proc. Albumose enthält, in Hollunderprismen und lasse erstarren. Nach dem Erstarren lege man die ganzen Prismen oder Schnitte davon in verschiedene Fixirungsflüssigkeiten: die Strahlungen sind ebenso schön wie in der gelatinefreien Albumoselösung und, falls das Fixirungsmittel die Gelatine fällt, eingebettet in deren Fällung. Sublimat fällt die Gelatine nicht, die Strahlungen liegen also isolirt in der klaren Gelatine. Mit Essigsäure (1 Proc.) angesäuerte Osmiumsäure (1-proc.) fällt die Gelatine als äusserst engmaschiges Gerüstwerk und bettet in dieses die prachtvolle Albumosestrahlung ein. Es entsteht das Ebenbild einer Zelle, oder bei mehreren Kernresten bi- und tripolare Theilungsbilder (Fig. 13*a* p. 222).

Chromsäure oder Pikrinsäure erzeugen ebenfalls Strahlungen aus Albumose, inmitten einer bald gröber, bald feiner schaumig, bald fein gerüstig gebauten, polymorphen Fällung der Gelatine, über deren Entstehung man das Kapitel über die Wabenlehre vergleichen wolle.

Albumosefreie, 10-proc. erstarrte Gelatine entwickelt weder in Sublimat noch in Osmiumsäure irgend welche Strahlungen, während in Pikrinsäure aus später zu besprechenden Gründen grob tropfige Gelatinestrahlen entstehen, die leicht von den Albumosestrahlungen sich unterscheiden lassen.

In 20-proc. erstarrter Gelatine mit 5 Proc. Albumose entstehen in ganzen Hollundermarkprisen weder in angesäuerter Chromsäure, noch in Sublimat (1-proc.), einige unschöne Andeutungen abgerechnet, keine Strahlungen mehr. Das beruht nicht darauf, dass eine unsichtbare Structur der erstarrten Gelatine hinderlich ist, sondern darauf, dass diese in der hohen Concentration zu viel von den hereindringenden Fixirungsmitteln festhält und so die Bedingungen der Strahlen-

bildung aufgehoben werden. Denn auch Sublimat, das die Gelatine nicht wirklich fällt, ist doch von ihr beeinflusst, denn es bedarf nur eines Zusatzes von etwas Salzsäure, um die Gelatine zu fällen. Taucht man dünne Markschnitte mit 20-proc. erstarrter Gelatine + 5-proc. Albumose in einen Tropfen 1-proc. Sublimat unter, so dass von allen Seiten die Diffusion gleichzeitig beginnt, so entstehen auch in dieser sehr festen Gallerte, nur etwas langsamer, allgemein die schönsten Strahlungen.

Legt man die Prismen und Schnitte in die Fixirungsmittel ein, so lange die 5-proc. Gelatine noch flüssig ist, so bilden sich die Albumosestrahlungen genau so aus, wie in der erstarrten. Löst man die Albumose in einer 5-proc. Lösung von Gummi arabicum, so schiessen auch in diesem stark viscösen Medium die Strahlungen ebenso elegant an, wie sonst auch.

Man erkennt hieraus, dass die Fremdstrahlung auch durch viscose und gelatinöse Consistenz nicht verhindert wird. Das sind aber gerade diejenigen physikalischen Zustände, die man beim lebenden Protoplasma vorauszusetzen hat.

IV. Abschnitt. Das monomorphe Protoplasma.

Wenn die neueren Protoplasmatheorien als monomorphistische bezeichnet werden, so ist damit nur die allen gemeinsame Neigung gemeint, die lebende Substanz in ein gewisses Schema des rein morphologischen Aufbaues einzuzwängen, unbeschadet um die physiologische Deutung, die man mit der Structur verbindet. Denn es könnte doch Jemand wohl den granulären Bau als allgemein verbreitet anerkennen, ohne aber im Sinne Altmann's die Granula als Elementarorganismen und damit die Zelle als eine höhere Einheit, als wohl sonst üblich ist, aufzufassen. Auch könnte man die Gerüststructur zwar als die allein lebensfähige Gestaltung des Protoplasmas sich denken, ohne daran noch die besondere Hypothese zu knüpfen, dass auch dahinter noch eine feinere Zusammensetzung aus winzigen Elementarorganismen sich verstecke. Als Brücke (I, p. 381) die Zellen Elementarorganismen nannte, betonte er zwar die Möglichkeit, dass diese selbst aus noch kleineren Elementen, die sich zu ihnen wie die Zellen zum Gesammtorganismus verhalten würden, bestehen könnten, fügte aber hinzu: „aber wir haben bis jetzt keinen Grund, dies anzunehmen". Brücke hielt also die Zelle selbst für den Elementarorganismus, die Hauptmasse des Zellleibes aber für einen „complicirten Aufbau aus festen und flüssigen Theilen" (I, p. 401), dessen „wesentliche architektonische Elemente unseren Blicken bis jetzt vollständig entzogen sind" (I, p. 405).

In diesen Bemerkungen Brücke's hat für die neuere Zellforschung die Aufforderung gelegen, den Blick zu schärfen und die architektonischen Elemente zu entdecken, dabei übersehend, dass Brücke den noch verborgenen complicirten Aufbau desshalb so betonte, weil ihm die damals (1861) geläufige Annahme, dass der Zellinhalt eine Flüssigkeit sei, nichtssagend erschien. Neben der Flucht in die Unsichtbarkeit der Structur, die manchem, Brücke's Anregung folgend, wohl behagt, hat eine allgemeine Organsucht die neuere Zellforschung befallen und ist in der neueren Körnchenforschung mit an-

scheinend blendenden Erfolgen weit über das zulässige Maass hinausgeschossen. Was morphologisch in dem Protoplasma sich abhebt, kann ja wirklich ein besonderes Organ sein, aber das morphologische Verhalten allein qualificirt dazu doch noch nicht, wenn nicht physiologische Gründe sich anführen lassen. Von den Centrosomen absehend, nenne ich nur folgende Früchte dieser Organsucht: die Physoden, nach Crato (I und II) sich selbständig bewegende Zellorgane, die besonders dem Transporte dienen sollen; die Karyoiden, (Palla, I), ferner die zahlreichen Organe, die Schütt (I, p. 80, 81) in den Peridineen unterscheidet. Endlich die Leitkörperchen, die Metzner (I, p. 326) schon im ruhenden Kern erkennen will und während der Mitose an den Chromosomen wiederfindet, wo sie die Anheftung der Spindelfibrillen vermitteln sollen. Dieses rein construirte Organ ist doch in Wirklichkeit weiter nichts, wie ein stark gefärbtes Körnchen.

Eine so grundlose Aufstellung neuer Zellorgane, wie in den genannten Beispielen, ist doch ganz gewiss nicht im Sinne Brücke's und für die Erforschung des Protoplasmas ganz werthlos, wenn auch vielleicht ein vorübergehender Beifall für die „Entdeckung“ lohnt. Ich bin der Ansicht, dass auch heute noch jeder Grund zu der Annahme fehlt, das Protoplasma sei selbst wieder aus Elementarorganismen zusammengesetzt, die entweder selbst der stärksten Vergrösserung nicht zugänglich wären oder als anscheinend belanglose Structuren, wie Granulis oder Fädchen u. dergl., nur missverstanden wären. Ja, ich möchte noch weiter gehen und auch die Organsuche nicht allzu eifrig betrieben sehen, besonders nachdem gezeigt worden ist, dass die Eiweisskörper im Zustande der Fällung und Wiederlösung alle jene Gestalten wiederholen, die in dem Protoplasma verbreitet sind. Es ist desshalb sogar nothwendig, dass man erst einmal die in der lebenden und fixirten Zelle sichtbaren Structuren mit den structurirten Fällungen der Eiweisskörper sorgfältig vergleicht, um zu ermitteln, wie viel davon eine wirkliche „Lebensstructur“ ist, wie viel als farbiger Abglanz des Lebens nur desshalb entsteht und entstehen muss, weil das Protoplasma aus Eiweisskörpern besteht, die auch ohne den Odem des Lebens protoplasmagleiche Structuren annehmen.

Die Annahme einer sich vielleicht mehrmals wiederholenden, uns unsichtbaren und dauernd verschlossen bleibenden Organisation bis herab zu den letzten Elementarorganen würde uns in der Erkenntniss des Lebens keinen Schritt vorwärts bringen.

Denn da die chemischen Bausteine doch dieselben sein müssten, wie die der gröberen, uns sichtbaren Zellelemente, so bliebe nach wie vor das Räthsel des Lebens gleich unlösbar, die Lösung wäre nur eine Etappe weiter in das Unsichtbare verschoben.

Das polymorphe Protoplasma, so wie es uns in der Zelle, dem Elementarorganismus zugänglich ist, weiter zu erforschen, würde demnach die morphologische Betrachtung nicht genügen. Man hätte vielmehr schon an die sichtbaren Structuren mit ganz anderen Fragen heranzutreten.

Kapitel I. Die Granulatheorie.

Die besonders durch Altmann's Darstellung allbekannte Granulatheorie ist so oft kritisirt worden, dass ich wohl nur auf den Haupt-

einwand, ALTMANN fasse Granula der verschiedensten Natur unberechtigtermaassen als Bioblasten zusammen, hinzuweisen brauche. In diesem Sinne haben sich z. B. BÜTSCHLI (III, p. 126—129) VERWORN (I, p. 67), FLEMMING (z. B. XIV, p. 60) geäussert. EHRLICH (II, p. 132, 136) hält die Granulationen der Leucocyten nicht für Elementarorganismen, sondern für Secretionen eines oder mehrerer unbekannter Stoffe und wendet sich auch im Allgemeinen gegen die Bioblastenlehre, schon aus dem Grunde, weil auch körnchenfreie Zellen vorkämen. PRZESMYCKI (I, p. 626) und viele Andere sind derselben Ansicht.

Die allgemeine theoretische Grundlage der Granulalehre bedarf daher keiner nochmaligen Widerlegung, ich halte mich aber für verpflichtet, auf einige Punkte noch genauer einzugehen, weil meine vorläufigen Mittheilungen über die Granula zu Missverständnissen geführt haben.

Ich hatte (I, p. 679) gesagt: „Ob die mitgetheilten Beobachtungen (d. i. die granuläre Fällung der Albumose) dazu berechtigen, die ALTMANN'schen Granula schlechthin als Kunstproducte zu verwerfen, soll hier nicht ausführlich untersucht werden, nur sei darauf hingewiesen, dass Pepton und Propepton in den Säften der thierischen Zellen gewiss sehr häufig auftreten und Täuschungen herbeiführen können. Da ALTMANN selbst die Fehlerquellen seiner Methode nicht geprüft hat, so dürfte gewiss Vorsicht anzurathen sein." Dieser Satz ist von Einigen so verstanden worden, als ob ich das Vorkommen von Granulationen in den lebenden Zellen leugnen und alle ALTMANN'schen Granula als ausgefällte Albumosen erklären wollte. Das konnte ich nicht behaupten, denn dass Granula in lebenden Drüsenzellen und Leucocyten sichtbar sind, war mir doch bekannt. Ich wollte doch nur davor warnen, alle mit ALTMANN's Methode roth gefärbten Granulationen in einen Topf zu werfen, da die Methode unfehlbar doch granuläre Artefacte liefern muss, sobald Albumosen in den Zellen vorkommen. Die echten Peptone scheinen nach p. 60 weniger wichtig; das Amphopepton, was ich untersuchte, gibt aber auch (p. 41) granuläre Fällungen. Nachdem die in der Literatur zerstreuten Angaben über Albumose in thierischen Geweben (p. 60) und auch die Grundlagen für einen fixirungsanalytischen Nachweis der Albumose (p. 62) zusammengestellt worden sind, wird es nothwendig sein, auf die Artefactfrage hier näher einzugehen.

1) Fettgranula. Als einen fundamentalen Beweis für die Bioblastenlehre hat ALTMANN (I, p. 86) die Beobachtungen über die Fettresorption hervorgehoben. Er und seine Mitarbeiter (KREHL, METZNER) glauben sicher nachweisen zu können, dass die in der fettfreien Zelle sich mit Säurefuchsin roth färbenden Granula nach Fettfütterung mehr und mehr Fett aufnehmen und demgemäss mit Osmiumsäure sich schwärzen und dass das aufgenommene Fett von den Bioblasten weiter verarbeitet werde, was morphologisch durch eine Umwandlung der geschwärzten Vollkörner in Ringkörner veranschaulicht werde. Jetzt müsste also die „fuchsinophile" Grundmasse der Granula doch innerhalb des Fettringes wieder sich nachweisen lassen. In ALTMANN's Hauptwerk (I, p. 80, Taf. III, Fig. 5) wird ein solcher Fall aus der Fettleber des Frosches beschrieben, bald darauf aber hervorgehoben (I, p. 83): „Im Allgemeinen ist es aber doch sehr schwierig, den Zusammenhang von sich mit Osmium schwärzenden

Granulis und etwaiger specifischer Säurefuchsinfärbung derselben so nachzuweisen, dass ein Irrthum oder eine Verwechselung sicher ausgeschlossen ist". Und weiter wird hinzugefügt, das die fuchsinophilen Granula bei ihrer Umbildung zu fettassimilirenden Bioblasten sich chemisch so verändern könnten, dass die specifische Farbenreaction verloren geht. Auch Krehl (I, p. 108) sagt: „Ein directer Nachweis der Identität (d. i. der fuchsinophilen und der Fettgranula) etwa durch gleichzeitige rothe und schwarze Färbung, stösst auf grosse Schwierigkeiten." Dennoch scheint es Krehl (I, p. 110) an sehr frühen Stadien der Fettresorption bei der Ratte gelungen zu sein, „innerhalb des durch Osmium geschwärzten Kugelmantels durch die specifische Färbung mit Säurefuchsin Granulasubstanz nachzuweisen". Auch Metzner (II, p. 91, 92, 94, Fig. 7 u. 8a) hat diese Schwierigkeit nicht besser überwinden können.

Starke (I, II), der früher ein treuer Anhänger der Granulalehre war, hat dagegen ganz abweichende Ansichten entwickelt. Er fand (I, p. 143) in der lebendfrischen Froschleber die Fettgranula in gleicher Form, Zahl und Grösse wie nach der Fixirung, aber nur Vollkörner. Durch Osmium werden die Granula gelblich gefärbt und erst durch den Alkohol werden sie geschwärzt und theilweise in Ringkörner verwandelt. Hatte Starke (I, p. 140) „möglichst dünne Schnitte der mit Osmium behandelten und mit Wasser gespülten Leber für 3—24 Stunden in absoluten Alkohol gebracht, so präsentirten sich in den meisten Fällen nach Einwirkung desselben sämmtliche Fettgranula als Ringkörner. Wurden Schnitte derselben Leber in 90-proc. Alkohol gelegt, so zeigten sich nach der Einwirkung desselben sämmtliche Granula als Vollkörner." Die Ringkörner müssen also secundär durch den Einbettungsalkohol erzeugt werden, der auch erst ihre Schwärzung veranlasst, denn nach Starke (II, p. 83) soll absoluter und verdünnter Alkohol an und für sich schon das Osmiumtetroxyd reduciren. Eine „Rothfärbung im Centrum der Ringkörner" sah Starke (II, p. 77) niemals, „das Centrum blieb hell, farblos, homogen, wie eine Lücke und wie vorher auch". Ich habe diese Ringkörnerbildung nicht nachuntersucht und führe die verschiedenen Angaben hier nur an, um zu zeigen, dass die Rolle der fuchsinophilen Granula bei der Fettresorption noch keineswegs so sicher festgestellt ist, um als eine der wesentlichsten Stützen der Bioblastenlehre dienen zu können.

Die Schwärzung der mit Osmium fixirten Granula, die Starke dem Alkohol zuschreibt, ist doch wohl nur eine Lichtwirkung, die sich z. B. auch an mit Osmiumsäure gefällten Eiweisskörpern (Albumose, Albumin etc.) einstellt, sowohl in Wasser, als in Alkohol. Daneben wird man aber auch auf geschwärzte Körner, die sicher nicht aus Fett bestehen, neben nicht geschwärzten Körnern treffen, so dass die Fettbestimmung durch Osmiumschwärzung, sobald die osmirten Objecte nicht sofort untersucht werden, sehr unzuverlässig wird.

2) Geschwärzte Granula, die nicht aus Fett bestehen, fand Korschelt (III, p. 8, 18) in reifenden Eiern von Dytiscus, R. Heidenhain (I, p. 80—86) in den Leucocyten der Dünndarmwand. Ich fügte (III, p. 38) eine blaugrüne Alge, Hapalosiphon hinzu und kann als weitere Beispiele den Siebröhreninhalt von Cucurbitaceen und alle den Siebtheil umgebenden Parenchymzellen, ferner das Mesophyll und Nervenparenchym von Bryonia und andere Pflanzenobjecte hinzufügen.

Die Leucocytengranula im Hundedarm verhielten sich so, wie es R. Heidenhain angibt, sie färbten sich nach osmiumhaltigen Fixirungsmitteln und Alkoholbehandlung theils mit Säurefuchsin roth, theils waren sie geschwärzt und dazwischen fanden sich alle Uebergänge, denen man es ansah, dass das die Rothfärbung verhindernde, die Granula schwärzende Osmium bald mehr, bald weniger reich eingelagert war. Durch mehrstündige Behandlung mit 1-proc. Kali konnte das Osmium entfernt und eine allgemeine Rothfärbung der Leucocytengranula erzielt werden. Auch in den genannten pflanzlichen Objecten waren solche bald mehr schwarz, bald mehr roth aussehende Granula zwischen tief schwarze und rein rothe eingestreut. Es wird einer eingehenden Untersuchung bedürfen, um die Ursachen dieser theilweisen Schwärzung, die doch erst secundär sein könnte, aufzuklären. Es könnte aber auch die Osmiumsäure sogleich reducirt werden. Sollte das erstere der Fall sein, so wäre wohl zu bedenken, dass die Quantität des in die Granula aufgenommenen Osmium den Ausschlag geben könnte. Ich muss mich auf diese Bemerkungen beschränken, aus denen man erkennen möge, wie die Nachbehandlung osmirter Objecte ganz unerwartete und irreführende Aenderungen hervorufen kann. In Pollenmutterzellen von Magnolia hat vor Kurzem auch Guignard (III, p. 194) nach Fixirung mit Flemming'scher Lösung solche geschwärzte, sicher nicht aus Fett bestehende Granula beschrieben. Ich habe dieselben Gebilde gefunden in Pollenmutterzellen von Funkia, Lilium, Hemerocallis und bin der Ansicht, dass ihr Erscheinen mit der Auflösung der Tapetenschicht zusammenhängt.

3) Fuchsinophile Granula. Der Werth der Altmann'schen Färbemethode (Säurefuchsin mit Pikrinalkohol differenzirt) wurde schon p. 108 auf das rechte Maass eingeschränkt, eine specifische Färbung der Bioblasten gibt sie nicht, ebenso wenig wie das Chromosmiumgemisch ein specifisches Fixans dafür ist (vergl. p. 16). Dennoch kann es überraschen, dass alle Zellgranulationen, gleichviel in welcher Drüse, gleichviel ob in einem beliebigen anderen Organ des Körpers oder in Leucocyten mit Altmann's Technik gleichförmig sich herausheben lassen. Altmann's Abbildungen frappiren besonders dadurch, dass die Zellkerne, die doch sonst am stärksten sich färben, und auch das intergranuläre Cytoplasma gänzlich entfärbt sind, weshalb die Granula allein noch durch ihre Färbung aufdringlich hervorspringen. Die Zellkerne sind vor der Pikrindifferenzirung ebenso stark gefärbt, wie die Granula, denn sie sind ja, da sie nicht aus reiner Nucleinsäure, sondern aus Nulein bestehen, auch nicht total acidophob. Dass die Kerne aber trotzdem sich schneller entfärben als die Granula, beruht darauf, dass die Kernsubstanz (resp. das Nuclein) weder durch Osmiumsäure noch durch Kaliumbichromat gefällt wird (p. 49) und daher in dem Präparate gar nicht oder nur soweit osmirt ist, als vielleicht etwas Osmium und auch Chromat so fest adsorbirt wird, dass es nicht herausgewaschen werden kann. Die definitive Fixirung der Kerne besorgt erst secundär der Einbettungsalkohol. Die Substanz der Granula aber, gleichviel aus welchem Eiweisskörper sie besteht, ist wohl nucleinfrei und wird durch das Osmium fixirt, das sie sehr dicht zusammenschweisst und so sehr widerstandsfähig gegen die Entfärbung macht. Selbst wenn das intergranuläre Cytoplasma aus derselben Substanz bestände, was ja sicher nicht zutrifft, so müsste doch infolge seiner zarten Beschaffenheit es

sich schneller entfärben, wie die substanzreichen, grösseren Granula, genau wie in den Granulagemischen aus Albumose die kleinen und kleinsten Granula. Durch Anwendung einer sehr concentrirten, die Adsorption begünstigende Farblösung sorgt obendrein ALTMANN dafür, dass das Säurefuchsin maximal eingelagert wird. Aus alledem ergibt sich der Erfolg der Methode von selbst, ohne dass eine specifische Verwandtschaft der Bioblasten zum Säurefuchsin eingreift. Sobald die Substanz der Granula mit Osmium sich verbindet, ist das Resultat unausbleiblich, gleichviel, ob Albumose, Albumin, Globulin oder ein anderer Stoff vorliegt. Auch der Aggregatzustand der Granula in der lebenden Zelle hat wenig Einfluss. Sind die Granula Vacuolen von sehr concentrirter Eiweisslösung, so werden sie entweder in toto als homogene Kugeln ausgefällt oder eine etwaige granuläre oder feingerüstige Fällung innerhalb der Vacuolen ist so dicht gehäuft, dass sie bei starker Färbung zu einem homogenen Bilde sich verwischt. Ist die Vacuolenflüssigkeit verdünnt, so könnte in der That ein Granulum der lebenden Zelle durch die Fixirung in mehrere zerfällt werden, was dem fixirten Präparate wohl nur ausnahmsweise anzusehen wäre. Sind aber die Granula schon intra vitam sphärokrystallinische und nur verquollene Ablagerungen von Eiweisskörpern, so werden sie, genau wie die Proteinkörner trockener Samen, auch in toto als Kugeln fixirt. Endlich bliebe noch die Möglichkeit, dass die Granula in der lebenden Zelle gar nicht zu sehen sind und erst durch die Fixirung als Artefacte ausgefällt werden. Das scheint sehr selten zu sein, denn die Drüsengranula, ferner die in dem Darm- und Magenepithel, die in Leucocyten sind doch schon am lebenden Object mehr oder weniger deutlich zu sehen. Dennoch wäre ja eine Anreicherung des granulären Bildes durch Fällungsgranula nicht ausgeschlossen. Ich muss es den Anatomen überlassen, zu entscheiden, ob die Zellgranula ursprünglich flüssige Vacuolen oder sphärokrystallinische Ablagerungen sind, die als Betriebsmaterial aufgespeichert und z. B. in den Drüsen erst in das Sekret umgeformt werden. Die Natur specifischer Zellorgane oder gar von Elementarorganismen ist aber doch sicher ihnen abzusprechen und an die grosse Uebereinstimmung mit den Proteinkörnern der Pflanzen nochmals zu erinnern (p. 274, 304, Taf., Fig. 38).

Als Artefacte könnte man die Granula von verschiedenen Gesichtspunkten aus bezeichnen. Sind sie ausgefällte Vacuolen, so sind sie in gewissem Sinne schon Artefacte, denn der ursprüngliche Zustand ist doch der gelöste. Sind sie aber granuläre Fällungen von im Protoplasma diffus gelösten Stoffen, so verdienen sie erst recht den Namen eines Artefactes. In diesem Sinne haben mich einige Forscher verstanden, z. B. E. MÜLLER (I, p. 309, 320), obgleich doch der schon p. 296 citirte Satz nicht so radical zu verstehen ist, dass alle ALTMANN'schen Granula gefällte Albumose sind. Während E. MÜLLER sich bemüht, die ursprüngliche ALTMANN'sche Lehre zu vertheidigen, versucht KRAUSE (I, p. 103, 117) den Nachweis, dass die Granula der fixirten Speicheldrüsen (Igel) insofern Fällungsgranula sind, als sie aus Eiweisslösung hervorgehen. Die Beschreibung KRAUSE's (I, p. 103) über die allmähliche Eindickung der Eiweisslösung, der dann gröbere Granula entsprächen, erinnert an die ebenso beschriebene Entwicklung der schon oft genannten Proteinkörner in den Pflanzen (WAKKER, I, p. 5—7, WERMIENSKI, I). Die chemische Natur der „Eiweisslösung“ bestimmt KRAUSE nicht näher, obgleich er, da er

sich auf meine erste Mittheilung bezieht, auch an Albumose gedacht haben wird. KRAUSE kann ich nur so verstehen, dass die Drüsengranula ausgefällte Vacuoleninhalte sind. Aehnliches strebt die Arbeit von SAUER (1) an. Da dieser (I, 123) im Nierenepithel mit Salpetersäurealkohol, KRAUSE (I. p. 117) in der Parotis mit Salpetersäure dauerhafte Granula erhielt, so ergibt sich, dass wasserlösliche Albumosen oder gar Pepton in diesen Fällen nicht das Material geliefert haben können oder doch nicht allein.

Auch die von ZIMMERMANN (III, p. 38) als weit verbreitet im Assimilationsgewebe der Pflanzen nachgewiesenen Granula können nicht aus Albumosen bestehen, denn sie werden durch Pikrinsäure oder 3-proc. Salpetersäure tadellos fixirt, auch von Alkohol. Da ZIMMERMANN in der Aufzählung (III, p. 39) Osmiumsäure nicht nennt, so hat er auch die Schwärzung zahlreicher dieser osmirten Granula nicht beobachtet, denn soviel ist wohl sicher, dass ZIMMERMANN's Granula und die auf p. 297 erwähnten dasselbe sind: die im lebenden Plasma schon sichtbaren Mikrosomen, die, wie ZIMMERMANN (III, p. 43) selbst zugibt, möglichenfalls verschiedenwerthig sind, wohl aber sicher aus Eiweisskörpern bestehen. Wenn ZIMMERMANN (III, p. 43) aus der gleichsinnigen Färbbarkeit auf identische Natur seiner Granula zurückschliessen will, so fehlt nach dem oben p. 298 Entwickelten dazu jede Berechtigung.

Die ALTMANN'schen Granula der thierischen Drüsen hat schon 1875 R. HEIDENHAIN (II, p. 583) in dem mit Alkohol fixirten Pankreas und auch am lebenden Material gesehen. Er nennt sie Zymogenkörner und meint, dass aus ihnen erst das Secret erzeugt wird. Sie wären also abgelagertes Reservematerial, genau wie die pflanzlichen Proteinkörner. Ausser den bereits genannten Autoren (KRAUSE, SAUER) hält auch PIERSOL (I, p. 599, 603) die Secretkügelchen der HARDER-schen Drüse der Amphibien für eine eiweissartige Substanz, was wiederum mit R. HEIDENHAIN's Ansicht über die Zymogenkörner übereinstimmen würde. Auch SOLGER (I), dessen Ansicht über die wahre Natur der Drüsengranula nicht recht klar hervortritt, scheint sie ähnlich aufzufassen. Da soeben erst HELD (III, p. 284) die Beschaffenheit der Drüsengranula, unter Anlehnung an meine Einwände gegen ALTMANN's Theorie behandelt hat, so bleibt für mich nur die Pflicht übrig, nachzusuchen, ob lösliche Albumosen gelegentlich granulär ausgefällt werden.

ALTMANN hat schon selbst (I, 32) bemerkt, dass auch andere Fixirungsmittel, z. B. Sublimat, Jod- und Bromkaliumquecksilberjodid, ferner Tanninlösungen Granulabildner geben, aber doch nur in vereinzelten Fällen, nicht so constant wie das specifische Fixirungsgemisch. Die von ALTMANN genannten Fixirungslösungen fällen alle die Albumosen granulär aus und können also in der jetzt zu behandelnden Frage nicht entscheiden. Man hat Alkohol, Pikrinsäue, kurz, solche Stoffe heranzuziehen, die die Albumosen gar nicht oder doch wasserlöslich fällen, woraus sich nach p. 64 der negative Theil des fixirungsanalytischen Nachweises der Albumose von selbst ergibt. Dieser Nachweis lässt sich in den Zellen nicht so glatt führen, wie es nach der methodischen Vorbereitung auf p. 62 zu hoffen war. Es bedarf jedes einzelne Object einer sehr eingehenden und langwierigen Untersuchung, die mehr Zeit erfordert, als ich bis jetzt darauf verwenden konnte.

Um die hierzu berufenen Anatomen zu solchen Studien zu ermuthigen, will ich doch zwei Beispiele mittheilen.

In den Fundusdrüsen des verdauenden Hundemagens[1]) sind die Belegzellen voller ALTMANN'scher Granula, wenn mit seinem Gemisch oder angesäuerten Osmiumsäure (+ 1-proc. Essigsäure) fixirt wurde. Auch Formaldehyd 4 Proc., Platinchlorid 1 Proc., ferner Kaliumbichromat (2,5 Proc.), Sublimat (7 Proc. in Wasser) verändern das granuläre Bild nicht, nur verlangen sie meist eine schwächere Differenzirung mit Pikrinalkohol, weil die Färbungstenacität des Osmiums weggefallen ist.

Sonderbarer Weise erzeugt 0,5 Chromsäure nicht solche Vollgranula wie die bis jetzt genannten Mittel, sondern sehr zahlreiche, prachtvolle Ringgranula, mit bald breiter, bald schwächerer Peripherie und entsprechender Höhlung. Die Ringgranula deuten darauf hin, dass die Substanzmasse, aus der die Vollgranula aufgebaut sind, kein einheitlicher Körper sein kann, sondern ein Gemisch mehrerer Stoffe, von denen der eine zum mindesten von der Chromsäure nicht oder doch nicht unlöslich gefällt wird. Da zwischen den Ringgranulis auch Vollkörner liegen, so verwickelt sich die Frage noch mehr. Es ist nicht möglich, aus den im ersten Theil zusammengestellten Fällungsreactionen den in den Ringgranulis fehlenden Stoff zu erkennen. Man könnte ja an Pepton denken (p. 41), dann müsste man aber erwarten, dass auch Kaliumbichromat oder Formaldehyd Ringgranula hinterlassen, was nicht der Fall ist. Doch wäre noch denkbar, dass die genannten Mittel, die entschieden die Granula lockerer und leichter entfärbbar machen, als die Chromsäure die Ringe, das Substanzgemenge mehr profuser fällen und so die Granula voll erscheinen, obgleich ein Stoff fehlt. FLEMMING's Gemisch, das ebenfalls Amphipepton (p. 41) nicht fällt, gibt auch in den Belegzellen keine Granula, vereinzelte Ringe lassen sich zusammensuchen, aber das Gesammtbild ist das eines lückenreichen, granulafreien Schaumplasmas.

Pikrinsäure-Fixirung (0,5-proc.) lässt selbst bei sehr milder Differenzirung mit Pikrinalkohol nirgends Granula hervortreten. Man wird sich aber mit Hilfe von Eisenhämatoxylin leicht überzeugen können, dass die Granula allgemein in den Belegzellen erhalten sind, freilich nicht überall so gehäuft, wie nach ALTMANN'scher Lösung. Es bleibt doch der Eindruck zurück, dass die Pikrinsäure nicht alles das fixirt, was das specifische Fixans zum typischen Granulabild vereinigt.

Wie die Pikrinsäure, die Peptone und Albumosen wasserlöslich fällt, wirkt auch der Alkohol, der das Material für die ALTMANN'sche Färbung auch nicht genügend vorbereitet. Besser zeigt Eisenhämatoxylin bei geringer Differenzirung, dass die Belegzellen doch mit Granulis reich erfüllt sind, nur wird man sofort erkennen, dass sie kleiner sind als nach ALTMANN'scher Fixirung. Um vergleichbare Messungen anstellen zu können, ist es nöthig, das Alkoholmaterial durch eine Nachbehandlung der Schnitte der specifischen Granulafärbung zugänglich zu machen. Am einfachsten dadurch, dass man den feuchten, aufgeklebten Schnitt mit einem Tropfen des Chromosmium-

1) Die Section zweier, 4—6 Stunden nach reichlicher Fütterung getödteter Hunde besorgte mein College HANS HELD, dem ich auch an dieser Stelle für seine werthvolle Unterstützung meinen besten Dank aussprechen möchte.

gemisches von ALTMANN vielleicht 1 Minute erwärmt und nun wieder in Wasser kurz spült. Jetzt gelingt die Granulafärbung mit Pikrinalkoholdifferenzirung so gut, als ob mit Chromosmium von vornherein fixirt worden wäre. Auch 1-proc. Osmiumsäure allein ist brauchbar, nur werden die Schnitte des Alkoholmaterials noch nicht so intensiv färbbar, was aus der früher hervorgehobenen Adsorption des Osmiums sich erklärt. Kaliumbichromat allein, stimmt zwar die Adsorption des Säurefuchsines nicht herab, genügt aber nicht, weil es keine Farbzähigkeit verleiht. Desshalb ist das ALTMANN'sche Gemisch, in dem das Osmium die Farbzähigkeit beim Entfärben steigert, während das Bichromat die nachtheiligen acidophoben Adsorptionseigenschaften des Osmiums überdeckt, vorzuziehen. Um die in Alkohol conservirten Granula noch fetter zu färben, kann man die Schnitte auch heiss $^1/_2$ Stunde mit 5-proc. Albumose imprägniren und den intergranulär gespeicherten Antheil mit Chromosmiumgemisch nachfixiren. Einfacher aber ist es, dieses, wie schon erwähnt, allein anzuwenden, damit keine verunreinigenden Ausfällungen entstehen.

Die Granula messen:

Fixirung	Granula		Kerne
	Durchschnitt	Extreme	
1-proc. Osmiumsäure (+ 1 Proc. $C_2H_4O_2$)	0,8—1 μ	0,4—1,4 μ	5—6 μ
ALTMANN's Gemisch	0,6—0,8 μ	0,4—1,4 μ	—
Alkohol	0,2—0,4 μ	0,2—0,4 μ	4 μ

Die durch Alkohol conservirten Granula sind, roth gefärbt gemessen, durchweg nur halb so gross und noch kleiner, als bei specifischer Fixirung und ausserdem fehlen alle grösseren. Dass der Alkohol nicht so stark geschrumpft hat, mag wohl aus der Grösse der Kerne einleuchten; die ganzen Epithelzellen waren gar nicht geschrumpft. Noch auf etwas ist hinzuweisen. Nach specifischer Fixirung sind die Fundusgranula sehr schön rund, als kuglige Gebilde, die in den Maschen des Cytoplasmas liegen unverkennbar, dagegen sind sie nach Alkoholfixirung, auch nachdem mit Chromosmium die specifische Färbung ermöglicht ist, meist weniger schön kuglig und zuweilen sieht es fast so aus, als ob sie im Cytoplasmagerüst liegende Körnchen seien und gar nicht alle den ALTMANN'schen Granulis entsprächen, als deren von Alkohol conservirbare Rester ich aber doch die meisten auffassen möchte. Der übrige, nicht fixirte Theil wird aber durch die oben genannten, Albumose fällenden Fixirungsmittel, wie Formaldehyd, Sublimat, ferner durch Tannin, Kaliumbichromat wohl erhalten, dagegen versagt Chromsäure, FLEMMING'sche Lösung, ebenso aber auch Pikrinsäure. Es scheint mir das angemessenste die Annahme, dass die Vacuolenflüssigkeit, die zu den Granulis fixirt wird und schon lebend granulär erscheint, ein Gemisch von mehreren Eiweisskörpern ist, unter denen sich auch nicht coagulirbare Verdauungsproducte des Eiweisses, Pepton und Albumose in wechselnder Menge befinden neben coagulirbarem Eiweiss. Dazwischen mischen sich wahrscheinlich noch zahlreiche Uebergangsstufen des Eiweisses in das specifische Secret der Drüse, von deren Reizungszustande das Mischungsverhältniss aller der genannten Stoffe abhängt. Demgemäss würden dann auch die

Fixirungsmittel wirken und ungleiche Bilder geben, die in den einzelnen Abschnitten der Drüse schon schwanken werden.

Einen zweiten Beweis für das Vorkommen löslicher Albumosen und Peptone verspricht die p. 65 ausgearbeitete Methode. Man fixirt mit angesäuerter Osmiumsäure und bringt die Schnitte zunächst in Permanganat-Salzsäure, entfärbt sie in Oxalsäure und laugt mit warmem Wasser aus. Wasserlösliche Albumosen und Peptone werden auf diese Weise gelöst. Die Fundusdrüsengranula verlieren natürlich durch die Entosmirung ihre intensive Färbbarkeit, sind aber in ihrer Form unversehrt erhalten. Unverkennbar ist aber, dass sie lockerer, weniger glänzend geworden sind, dass ein Theil ihrer Substanz, der gewissermaassen gleichmässig das Korn durchtränkte, entfernt worden ist. Imprägnirt man jetzt die Granulaskelette wieder mit Chromosmiumgemisch und färbt mit Säurefuchsin-Pikrinalkohol, so bleiben sie blasser, sind leichter entfärbbar, weil der durch obige Behandlung entfernte Bestandtheil nicht wieder ergänzt worden ist. Dieser herauslösbare Theil entspricht sicherlich dem, der durch Alkohol oder Pikrinsäure nicht gefällt wird und gehört in die Classe der Peptone und Albumosen. Ihn hier noch näher zu bestimmen, ist einstweilen unmöglich. Auch könnte ja ein Eiweissstoff vorliegen, dessen Eigenschaften den Peptonen und Albumosen der Laboratorien zwar sehr ähneln, ohne ihnen aber ganz gleich zu sein.

2) Dünndarmepithel des verdauenden Hundes, stimmt in Bezug auf seine Granula mit dem vorigen Beispiel nahezu überein, nur übertrifft es dieses vielleicht bei sehr eingehender Untersuchung, der allerdings die Kleinheit der Granula hinderlich ist, durch eine präcisere Wirkung des Alkoholes und der Pikrinsäure. Doch wird es hier nothwendig, auch den Hungerzustand heranzuziehen, was den Anatomen überlassen werden muss. Dann wird es auch mit Hilfe der hier entwickelten Methoden möglich sein, festzustellen, ob aufgenommene Verdauungsproducte des Eiweisses im Darmepithel so lange unverändert verweilen und sich vorübergehend so stark anhäufen, dass sie als Granula von geeigneten Fixirungsmitteln niedergeschlagen werden. Die Granula des verdauenden Darmes, die ich untersuchte, sind mit Altmann's Gemisch, ferner mit reiner, angesäuerter Osmiumsäure typisch darstellbar, während hier noch mehr Mittel als bei der Fundusdrüse versagen; neben Chromsäure und Flemming's Gemisch tritt noch Platinchlorid und auch Formaldehyd. Letzteres fixirt die Leucocytengranula der Darmzotten so, dass sie selbst nach starker Pikrinalkoholdifferenzirung intensiv roth gefärbt sind, während im Epithel keine Spur von Granulis zu sehen ist.

Auch schwach differenzirte Eisenhämatoxylinfärbung gibt keine deutlichen und allgemein granulären Bilder. Man erinnere sich dagegen, dass Formaldehyd die Fundusdrüsen ebenso schön granulär fixirte wie Altmann's specifisches Gemisch. Sublimat gibt Darmgranula, was auch Altmann (I, Taf. XII, Fig. 2) abbildet.

Alkohol und Pikrinsäure dagegen versagen und verhalten sich so wie gegenüber den Fundusdrüsen; secundär imprägnirt mit Chromosmiumgemisch färben sich die Epithelzellen zwar fein granulär an den Stellen, wo sonst die Altmann'schen Granula liegen, aber sicher fehlt jenen Körnungen sowohl Grösse als Gestalt dieser. Kaliumpermanganat etc. löst die mit Osmium fixirten Granula nicht, sondern wirkt wie in der Fundusdrüse.

Nach alledem ist es sehr wahrscheinlich, dass die Muttersubstanz der Epithelgranula ebenfalls ein Gemisch ist, in dem vielleicht Peptone etwas reichlicher vorkommen als in der Fundusdrüse. Zu ihnen würden sich hier Uebergangsformen des aufgenommenen Peptones in native Eiweisskörper gesellen.

Erst durch die Untersuchung anderer Drüsen wird man Gewissheit darüber erlangen können, ob allgemein die uniforme Wirkung des ALTMANN'schen Gemisches neben der Osmirung auch darauf beruht, dass Peptone oder Albumosen oder beide die Muttersubstanz der Granula durchtränken und ihnen besonders jene Färbungseigenschaften verleihen, die alle ALTMANN'schen Granula so übereinstimmend auszeichnet. Meiner Pflicht, das früher ausgesprochene Bedenken zu prüfen, glaube ich einstweilen genügt zu haben.

3) Die Proteinkörner der Pflanzen (Beispiel Lupinensamen) lasse ich hier folgen, nicht um den Botanikern Neues zu sagen, sondern um den Anatomen den Vergleich mit den ALTMANN'schen Granulis näher zu rücken. Die Körner des reifen, trockenen Lupinensamens sind sein Reservematerial an Eiweissstoffen, denen in den Globoiden complicirt zusammengesetzte Verbindungen aus dem Calcium- und Magnesiumsalz einer gepaarten Phosphorsäure mit organischem Antheil eingelagert sind. Die Hauptmasse des Proteinkornes besteht aber bei den Lupinen zum grössten Theil aus im Wasser zerfliessenden, sich langsam lösenden Eiweisskörpern, die im trockenen Samen gewissermaassen eingedickt und ausgefällt sind, aber schon während der Quellung des Samens im Wasser sich wieder zu lösen beginnen. Ein äusserstes zartes Häutchen, ebenfalls aus Eiweisskörpern, ist weniger leicht löslich. Die leichte Löslichkeit der Proteinkörner könnte zum Theil darauf beruhen, dass lösende Salze in sie eingelagert sind, so dass die Löslichkeit nicht ohne weiteres als ein Anzeichen für pepton- oder albumoseartige Körper anzusehen wäre, wenn nicht NEUMEISTER (VI, p. 461) in 24 Stunden gequellten Lupinensamen „erstaunliche Mengen“ von Pepton macrochemisch hätte nachweisen können. Er nimmt mit Recht an, dass das Pepton als Reservestoff in den Samen aufgespeichert ist. Wir können hinzufügen, dass es in den Proteinkörnern enthalten ist, die zweifellos ein Gemisch verschiedener Proteinstoffe sind, und sicher viel Peptone und vielleicht auch Albumosen enthalten. Lupinensamen, 20 Stunden in Wasser eingequellt und mit ALTMANN's Gemisch fixirt, liefern nach der specifischen Granulafärbung das vollkommene Ebenbild eine granulareichen Drüse, nur dass alles viel gröber und daher übersichtlicher ist (Taf., Fig. 38).

An dem fixirten Stück des Cotyledo sind die unter der Epidermis zunächst folgenden Zellschichten und ebenso die an den Schnittflächen durch die schnellste Wirkung des Fixirungsmittels ausgezeichnet, die Proteinkörner sind homogen in toto geronnen und nehmen das Säurefuchsin intensiv und zäh auf. Nach der Differenzirung mit Pikrinalkohol erscheinen sie als leuchtend rothe Proteingranula (Taf., Fig. 38). in den tieferen Schichten des fixirten Stückes aber eilte das Wasser des Fixirungsmittels etwas voraus und vacuolisirte zunächst die Lösung in den Proteinkörnern, die nun durch das bald nachfolgende und anscheinend sehr gut fällende Fixans nicht mehr homogen, sondern als sehr engmaschige Wabenwerke gefällt werden. Infolge der Vertheilung der farbspeichernden Substanz in zarte Schaumlamellen tritt jetzt schneller die Entfärbung ein und es entsteht das von ALTMANN

(I. p. 128 etc., Taf. XXVI, Fig. 2, Taf. XXVII, Fig. 2) als normales Hungerbild der Drüsen bezeichnete Negativ, die Proteingranula sind entfärbt, das intergranuläre Cytoplasma, in dessen Taschen oder Kammern je ein solches Korn liegt, bleibt gefärbt (Taf., Fig. 39). Der Erfolg beruht bei der Lupine aber nur auf der physikalischen Ablagerungsform der Körnersubstanz und dürfte vielleicht die Anatomen veranlassen, auch die Hungergranula der Drüsen daraufhin zu prüfen, ob sich nicht eine zarte intragranuläre Fällungsstructur erkennen lässt. In den Proteinkörnern ein und derselben Lupinenzelle ist dieses Schaumwerk bald weiter, bald enger (Taf., Fig. 40), und danach richtet sich auch die Färbung. Sind die Räumchen sehr eng und die sie begrenzenden Lamellen sehr zart, so entfärben diese sich schneller und geben leichter das negative Granulabild als Gesammtbild der Proteinkörner. Sind die Schaumwaben (Vacuolen) aber grösser, die Substanz der Proteinkörner also auf ein geringeres Volumen von Wabenwänden vertheilt, so sind diese breiter und substanzreicher und entfärben sich langsam (Taf., Fig. 40 unten und links). Denkt man sich diese riesengrossen Proteinkörner auf die Grösse der Drüsengranula reducirt, so würden die Wabenräume kaum sichtbar sein, aber die Färbungseigenschaften blieben dieselben und gäben bald vollkommen, bald halbwegs das negative Granulabild, dass bei schwacher Vergrösserung auch die Lupinenzelle gewährt (Taf., Fig. 39).

Ebenso wie Altmann's Gemisch wirkt auch angesäuerte Osmiumsäure. Die osmirten Proteinkörner werden langsam und theilweise in warmem Wasser gelöst, nachdem sie mit Kaliumpermanganat, Salzsäure und Oxalsäure behandelt worden sind.

Langsamer fällt wässrige Sublimatlösung die Substanzen der Proteinkörner, die daher zunächst Zeit haben, in dem Wasser des Fixans sich stark zu vacuolisiren. Desshalb sind ganz intacte homogene Körner selbst an der Peripherie der fixirten Samenstücke selten, die meisten sind sehr schön schaumig oder wabig, bald enger maschig, bald sehr weit und grob-vacuolig (Taf., Fig. 41), ja oft sind sie bereits zu riesigen Ringgranulis umgewandelt. Mittelgrosse Körner (Taf., Fig. 41 rechts) bestehen oft nur aus einer Centralwabe, an die sich eine einfache Alveolarschicht (im Sinne Bütschli's) herumlegt. Alle diese Bilder sind Artefacte, daran ist nicht zu zweifeln, und veranschaulichen sehr schön die „Zuverlässigkeit“ der Fixirungsmittel.

Noch weniger als Sublimat wirkt Flemming'sche Lösung fällend, wesshalb hier sichelförmige Lösungsstadien (Taf., Fig. 42) sehr häufig sind. Pikrinsäure wirkt ebenso wie der gleich zu beschreibende Alkohol und fällt die Hauptmasse der Proteinkörnersubstanz in wasserlöslicher Form.

Die Schnitte des Alkoholmateriales, zunächst ohne vorherige Wässerung in Alkohol gelegt, enthalten überall durch das ganze Stück hindurch homogene, intacte Proteinkörner, deren Substanz gleichmässig geronnen ist. Durch Wasser werden sie sehr bald schaumig-vacuolig, erst fein-nadelstichig, dann gröber, genau wie die p. 284 beschriebenen plumpen Albumosegranula. Während diese letzteren aber sich schnell lösen und in das schönste Wabenwerk verwandeln, lösen sich die Proteinkörner selbst in lauwarmem Wasser nur langsam und partiell; sie bleiben grob-vacuolig. Die Substanz ist also nicht in Wasser gut und vollständig löslich, besteht wahrscheinlich, wie die der Drüsengranula, aus einem Gemenge, das sicher Pepton reichlich

enthält. Die fixirten Samen waren alle 20 Stunden gequellt und befanden sich, geringe Differenzen abgerechnet, also auf gleichem Quellungszustande, besonders auch die Proteinkörner. Das ist besonders zu betonen, damit unser Beispiel richtig geschätzt werden kann, insofern es zeigt, dass die verschiedenen Fixirungsmittel an demselben Substrat, an den paraplasmatischen Proteinkörnern, recht verschiedene Bilder hinterlassen. Die Erforschung der Drüsen wird hieraus manchen Aufschluss sich entnehmen können, denn dass die Drüsengranula physiologisch als Reservestoffe den Proteinkörnern entsprechen, dürfte nicht zu bezweifeln sein und ist ja auch bereits durch HEIDENHAIN's Bezeichnung „Zymogenkörner" sanctionirt worden.

4) Die Intergranularsubstanz, der die Granulatheorie begreiflicherweise nur den Werth einer die Bioblasten zusammenhaltenden, nebensächlichen Zwischenmasse zuerkennt, rückt wieder in die erste Reihe ein, sobald die Granula zu paraplasmatischen Gebilden degradirt werden. Die Intergranularsubstanz ist das lebensthätige Cytoplasma, das in sich die granulären Vacuolen abscheidet. Daher liegt jedes Proteinkorn, jedes Drüsengranulum, genau wie dicht gedrängte Stärkekörner in einer geschlossenen Tasche oder Kammer von Cytoplasma, das also hier wabig gebaut sein muss. In trockenen Lupinensamen sind auch die cytoplasmatischen Kammerwände trocken und ähnlich fest also, wie in den fixirten Präparaten der gequollenen Samen oder der Drüsen und anderer granulärer Zellen. Dagegen sind im lebensthätigen Zustande die Kammerwände sicher nicht fest, sondern zähflüssige Lamellen, die erst durch die Fixirungsmittel erstarrt werden und durch diese infolge von Fällungen das feinpunktirte Aussehen bekommen. Sicher ist aber, dass die Granula nicht in den Knotenpunkten dieses erst bei der Fixirung fest werdenden Wabenwerkes liegen, wie BÜTSCHLI will. Hierüber vergleiche man p. 275. Es ist noch zu ergänzen, dass weder das gefärbte Präparat, noch die allgemeine Theorie der Vacuolenbildung zu BÜTSCHLI's Annahme berechtigen.

5) Fällungsgranula (Pseudogranula) würde man solche Granula nennen müssen, die aus diffus im Cytoplasma gelösten Stoffen durch die Fixirungsmittel abgeschieden würden, vergleichbar den aus Gemischen (p. 53) ausgefällten Albumosegranulis. Die ALTMANN'schen Granula gehören sicher ihrer Hauptmasse nach nicht zu den Fällungsgranulis, die Möglichkeit, dass hierdurch das granuläre Bild angereichert werden könnte, ist aber nicht zu bestreiten. Als ein sicheres Beispiel hierfür möchte ich die oben genauer besprochenen Granula der Fundusdrüse und des Darmepithels anführen.

In der Literatur sind gut färbbare granuläre Bildungen, die wohl Fällungsgranula sein könnten, oft beschrieben worden. Meine Absicht, einige solcher Beispiele nachzuuntersuchen, musste aufgegeben werden, weil das an und für sich schon erdrückende Material allzusehr anzuwachsen drohte. Ich begnüge mich daher mit dem Hinweis auf einige bereits beschriebene Fälle. Bei der Spermatogenese sind von FLEMMING (XV, p. 87, Taf. VII, Fig. 4—7, 13—16) „chromatische Körner" bis zu mehr als 10 μ Durchmesser von meist kugeliger oder doch abgerundeter Form beschrieben worden, die auch v. EBENER (I, p. 267—276) als tingirbare Körner ausführlich beschreibt. Ihm (I, p. 275) dünkt es wahrscheinlicher, „dass die tingirbaren Körner,

ähnlich wie das Fett, als das Endproduct eines Ernährungsstromes zu betrachten seien, der von dem Fusse der Spermatoblasten zu den Spermatozoiden geht und in den Plasmaanhängen der letzteren zu geformten Ausscheidungen noch anderer Art als Fett führt". Allerdings hebt v. EBENER (I, p. 267) besonders hervor, dass auch an frischen Isolationspräparaten glänzende Körnchen zu sehen seien, ohne aber zu untersuchen, ob diese nur Fettkügelchen waren oder neben ihnen bereits die tingirbaren Körner vorkamen. Da mit MÜLLERscher oder FLEMMING'scher Lösung fixirt wurde, so wäre, ebenso wie bei FLEMMING's Untersuchungen, die granuläre Fällung löslicher, besser diffundirender Albumosen, die als Nährmaterial herbeiströmten, wohl möglich gewesen. Dasselbe gilt für eine andere Art lebhafter Neubildung, für die Lymphdrüsen, in denen FLEMMING (XVI, p. 81) und einige seiner Schüler (XVI, p. 340, 345, 350, 354) wiederum tingible Körper reichlich gefunden haben. Färbten sich diese mit Safranin-Gentiana intensiv roth, so fehlte es auch nicht an „feineren" Körnchen, die gentianophil waren. Hier lag wohl zunächst nur eine Sortirung der Körner nach der Grösse vor, wie es jede Differenzirungsfärbung ausnahmslos besorgt (vergl. p. 110). Dieselben tingiblen Körner der Lymphdrüsen erwähnen auch RAWITZ (IV, p. 619—623), LÖWIT (IV, p. 75). Da immer mit FLEMMING's Lösung oder mit der MÜLLER's fixirt worden war, so ist eine Controluntersuchung mit anderen Fixirungsmitteln, die nach p. 65 zu wählen wären, sehr erwünscht. Um so mehr, als auch in Pflanzenzellen während der Theilung solche theils als extranucleäre Nucleolen bezeichnete Körner erscheinen, sobald mit FLEMMING's Gemisch fixirt worden war. HARPER (II, p. 71, Fig. 3—8) fand sie im Ascus der Pilze, OSTERHOUT (I, p. 161) in Spindelstadien der Sporenmutterzellen von Equisetum, ROSEN (II, p. 258, Fig. 11, Taf. II, Sublimatfixirung) in der Hyacinthenwurzel, ZIMMERMANN (I, p. 9, 17—19, Fig. 4—8, 12, 20) an verschiedenen Objecten nach Fixirung mit Chromsäure-Platinchlorid (MERKEL). STRASBURGER (III, p. 155—157) bemerkt, dass diese zahlreichen, nucleolenähnlich sich färbenden Körnchen bei Alkoholfixirung nicht immer, wohl aber bei FLEMMING'scher Fixirung zu sehen sind. Die Körnchen liegen theils im Cytoplasma, theils sogar in jungen Tochterknäueln (ROSEN, II, Taf. II, Fig. 11) auch zwischen den Spindelfasern (ZIMMERMANN, I, Fig. 20). Verweilen wir etwas bei ZIMMERMANN's Abbildungen, so fällt besonders Fig. 5 (Embryosack von Lilium Martagon) ins Auge, zu dem leider das Gegenstück nach der harmloseren Alkoholfixirung fehlt, was aber theilweise durch STRASBURGER's Bemerkung, dass nach dieser die Körnchen nicht immer da sind, ersetzt wird. Sobald der Kern zur Ruhe kommt, verschwinden nach ZIMMERMANN (I, p. 17—19) die tingiblen Körnchen wieder. Ja, ZIMMERMANN (I, p. 23) meint sogar, dass Kunstproducte ausgeschlossen sein müssen, weil die Zellen mit ruhenden Kernen n i e m a l s solche Körnchen enthalten, während ihre unmittelbaren Nachbarinnen mit mitotischen Kernen viel davon enthalten.

Statt dieses Trugschlusses liegt doch die Annahme viel näher, dass während der Kerntheilung lebhafte Stoffumsetzungen stattfinden, deren lösliche Producte entweder in fixirbaren Vacuolen sich ansammeln oder zwar diffus im Plasma sich ausbreiten, aber vom Fixirungsmittel granulär gefällt werden. Wiederum ist Controle mit Fixirungsmitteln von weniger vielseitiger Fällungskraft erforderlich.

Ein zoologisches Object mit zahlreichen solchen während der Mitose erscheinenden Körnchen beschreibt Häcker, leider wiederum nur nach Fixirung mit Sublimat oder Osmiumgemisch. Häcker nennt die Körnchen vornehm Ektosomen.

Alle diese Befunde laden zu weiterer Untersuchung ein, denn es handelt sich überall um ähnliche Phasen des Zellenlebens, lebhafte Neubildung im ganzen Organ, z. B. bei der Spermatogenese oder in den Lymphknoten, oder lebhafte Umwälzungen in der einzelnen Zelle bei der Mitose. Dass dabei lösliche Eiweisskörper herbeiströmen oder aus vorübergehenden Ablagerungsformen gelöst werden, versteht sich beinahe von selbst.

Ein Beispiel, das ich näher untersucht habe, scheint mir hierauf einiges Licht zu werfen. Wenn die Pollenmutterzellen jugendlicher Antheren aus dem Gewebeverbande sich gelöst haben und isolirt in der das Pollenfach erfüllenden Flüssigkeit schwimmen, wird bekanntlich die sog. Tapetenschicht zerstört und gelöst, um zur Ernährung der Pollenzellen verwendet zu werden. Jetzt findet man z. B. bei Lilium candidum nach Fixirung mit Hermann'scher Lösung und Färbung mit Säurefuchsin-Pikrin längs der sich auflösenden Tapetenschicht und auch überall reichlich zwischen den Mutterzellen Granula aller Grössen eingestreut, die schön roth gefärbt sind, genau wie die chromatischen Theile des Kernes, obgleich beide sicher aus verschiedenen Substanzen bestehen. Die Granula erreichen einen Durchmesser bis zu ca. 2 μ und noch mehr, liegen reichlich gehäuft beisammen und sind mit hefesprossähnlichen Zwillingsbildungen, wie in den künstlichen Albumosefällungen untermengt. An der Wand des Pollensackes, also im Bereich der zerstörten Tapetenschicht, sind die Granula am grössten, während im Centrum zwischen den Mutterzellen sie meist kleiner, staubartiger werden. Sie fehlen gänzlich in dem angrenzenden, nicht vergehenden Antherengewebe, und in den Mutterzellen könnten nur winzige roth bleibende Körnchen des Cytoplasmas mit ihnen zusammenhängen. Das wäre verständlich, wenn wirklich ein gelöster, granulär ausgefällter, albumoseähnlicher Eiweisskörper vorläge, der, sobald er in die Mutterzelle eindringt, weiter verarbeitet wird. Neben den reinen Granulis breitet sich der betreffende Stoff auch stellenweise in grösseren amorphen, homogenen Massen aus, als ob die Gestalt, die er im zähflüssigen Zustande angenommen hatte, unverändert fixirt worden wäre. Sicher sind diese Granula, die auch mit Safranin oder mit Eisenhämatoxylin sich färben, durch die Fixirung in Wasser unlöslich geworden. Nicht anders ist das Bild, wenn mit Flemming's Lösung fixirt worden war, nur sind die grösseren und sehr grossen Granula weniger häufig. Ganz anders sieht die fragliche Zone aus, wenn Alkoholmaterial mit Säurefuchsin oder mit Eisenhämatoxylin gefärbt worden ist. Die Granula fehlen, statt ihrer dominiren gerinnselige Ausfällungen, die zwar auch bei den anderen Fixirungen vorkommen, aber doch hinter den Granulis zurücktreten. Die Gerinnsel sind weitmaschig-gerüstig und bestehen wohl aus derselben durch Alkohol coagulirbaren Substanz, die auch in Hermann's oder Flemming's Gemisch gerinnselig ausfällt. Der die Granula bildende Stoff ist aber aus dem Alkoholpräparat durch das Wasser herausgelöst worden. Er wird sichtbar, wenn man den Paraffinschnitt ohne Wasserbehandlung in Alkohol ungefärbt einstellt. Die feinpunktirt-gerinnseligen und wasserbeständigen Niederschläge sind von

ölig glänzenden, homogenen Massen und Tröpfchen besetzt und überzogen, die genau so aussehen, wie eine alkoholische Fällung einer Albumose. Lässt man Wasser zufliessen, so verschwinden diese glänzenden Massen, und das feinpunktirte Gerüst tritt rein und so hervor, wie es nach gewöhnlichen Färbungspräparaten oben beschrieben wurde. Der Alkohol hat also zweifellos die granulabildende Substanz zwar gefällt, aber nicht coagulirt, was sicher dafür zeugt, dass in einen wasserlöslichen, nicht coagulirbaren Eiweisskörper, wohl eine Albumose, die Hauptmasse des Tapetenzelleninhaltes, dessen gerinnbare Reste in den gerüstigen Niederschlägen sich erhalten haben, verwandelt worden ist. Dieser, leichter als Albumine oder Globuline diffundirende Stoff dient als Hauptnahrung für die sich ausbildenden Pollenkörner.

Ob die neuerdings von Ikeno (I, p. 564) beschriebene Proteinsubstanz, die in heranreifenden weiblichen Organen von Cycas durch Flemming'sche oder Merkel'sche Lösung oder Sublimat ausgefällt wird, auch zu den Albumosen gehört, ist nicht zu entscheiden, weil vergleichende Fixirung mit Alkohol oder Pikrinsäure fehlt. Sicher werden aber solche Substanzen in ähnlichen Phasen öfter, wahrscheinlich sogar ganz regelmässig vorkommen.

Ob auch pathologische Processe im Thierkörper lösliche, zu den Granulabildnern gehörige Eiweisskörper abspalten, möchte ich, da eigene Erfahrungen mich dazu nicht berechtigen, hier auch nicht theoretisch verfolgen. Doch scheint mir die Frage wohl einer Untersuchung bedürftig, die nach dem auf p. 62 aufgestellten Schema zu beginnen hätte. Auf einige, nach der Literatur zu beurtheilende Fälle sei noch hingewiesen. Die seit Flemming's (XII, p. 223) erster Mittheilung als Chromatolyse bezeichnete Erscheinung würde dasselbe mikroskopische Bild geben, wenn ausser der chromatischen Substanz der vergehenden Kerne auch noch andere granulabildende Eiweisskörper gelöst wären und durch geeignete Fixirungsmittel unlöslich granulär oder bröckelig gefällt würden. Flemming (XII, p. 225) hält einen solchen Einwand zwar desshalb für belanglos, weil in demselben Schnitt Follikel mit normalem Epithel und solche mit Chromatolyse sich finden, und weil ausser seinem Fixirungsgemisch auch reine Osmiumsäure dieselben chromatolytischen Bilder fixirte. Diese Gründe sind nicht mehr stichhaltig, nachdem die gleichsinnige Wirkung dieser beiden Fixirungsmittel auf Granulabildner, wie Albumosen, bekannt geworden ist. Die untergehenden Follikel könnten ja ähnliche Stoffe enthalten, die den gesunden fehlen, und so in demselben Präparate beide Bilder sich vereinigen.

Ferner erinnere ich an die von M. Heidenhain (II, p. 164, Taf. XI) beschriebenen Degenerationsformen granulirter Leucocyten, in denen durch Sublimat sehr wohl Fällungsgranula, wie in Fig. 23 und 24, Taf. XI, hätten entstehen können. Der Autor glaubt, dass mehrere der ursprünglich in der Zelle vorhandenen Granula zu den fremdartigen Körpern zusammengeflossen sind.

Man wolle nicht übersehen, dass auch das Hämoglobin ein partieller Granulabildner ist und besonders durch Alkohol (p. 44) granulär gefällt wird, schon aus einer ca. 2-proc. Lösung in Körnern bis zu 1,5 μ Durchmesser, der in Kaliumbichromat sogar bis auf 5 μ steigt. Der viel höhere Hämoglobingehalt des Blutes könnte also bei krankhaften Lösungsprocessen auch zu grösseren Fällungsgranulis in

Alkohol oder MÜLLER'scher Lösung Veranlassung geben. TOUTON (I, p. 430) fand Kugeln der verschiedensten Grösse bis zu 25 μ Durchmesser, ebenso KLIEN (I, p. 125) bis 15 und 19 μ. Starke, 40-proc. Albumoselösung gab bei langsamer Fällung mit Kaliumbichromat Granula bis zu 8 μ, mit Platinchlorid bis zu 10 μ Durchmesser. Wenn in kranken Gewebsstücken auch nicht so concentrirte Lösungen vorausgesetzt werden sollen, so könnte doch die langsamere und länger andauernde Wirkung des Fixirungsmittels das Wachsthum der Pseudogranula bis zu den oben genannten Grössen begünstigen. RUSSEL (I, p. 1356) fand in 45 Carcinomen 43mal fuchsinophile Körner bis 12 μ Grösse, die meisten 4 μ. Er vermuthet, dass sie einen pathogenen Sprosspilz vorstellen. Sprossähnliche Zwillingsbildungen mit einem grossen Mutter- und kleinem Tochterkorn kommen auch in den Albumosefällungen vor (p. 33), und desshalb sind solche Bildungen an und für sich noch kein Argument für RUSSEL's Deutung, der sich ja viele Pathologen angeschlossen zu haben scheinen. Auch die Alkoholfällung des Hämoglobines neigt besonders zur Bildung von granulären Sprossverbänden (p. 45), ebenso die mit Kaliumbichromat (Fig. 6 *b*, p. 45). Die von den genannten Autoren und anderen stets hervorgehobene ungleiche Grösse dieser fuchsinophilen Körner in Geschwülsten, ebenso ihre Zusammenlagerung zu Nestern von 20 und mehr (RUSSEL, I, p. 1358, KLIEN, I, p. 125, TOUTON, I, p. 430) erhöhen die Aehnlichkeit mit den in Albumingerinnsel eingebetteten Granulis unserer früheren Versuche (p. 51) so stark, dass der andere Gedanke, es könnten nur verschieden gut genährte Individuen eines hefeähnlichen Parasiten sich zusammengelagert haben, als der gekünsteltere erscheint. Auch dass oft Solitäre von besonderer Grösse vereinzelt liegen, würde noch nichts gegen die Artefactnatur beweisen.

Näher auf diese, für die pathologische Histologie und Diagnostik wichtigen Fuchsinkörperchen darf ich als Laie hier nicht eingehen. Ich wollte nur zeigen, wie vielleicht ein weiterer Einblick zu gewinnen wäre. Zuerst müsste man mit Hilfe des im ersten Theil dieses Buches Zusammengestellten sich darüber Gewissheit verschaffen, ob alles, was als fuchsinophiles Körperchen auch bei verschiedenen Fixirungen erscheint, auch wirklich homolog ist. Es wäre leicht, Granula aus Hämoglobin von solchen aus albumoseartigen Körpern sofort zu unterscheiden; die letzteren müssten im Alkoholmaterial fehlen, die ersteren z. B. nach Fixirung mit ALTMANN's Gemisch oder Chromsäure. Ueber MÜLLER'sche Lösung gegenüber Hämoglobin vergleiche p. 46. Jedoch könnte dieses Fixirungsmittel im Gewebe auch anders, so wie reines Bichromat, wirken.

Dass die Eiweisskörper des thierischen Leibes durch Parasiten in Pepton und Albumose verwandelt werden können, ist nicht zu bezweifeln, da z. B. viele Bacterien peptonisirendes Enzym bilden. Es könnte sogar der sichere Nachweis von Pseudogranulis, die aus Albumose bestehen, dazu dienen, die Wirkung der pathogenen Parasiten zu erkennen und vielleicht mit ihrem Verhalten in den Reinkulturen zu vergleichen. Auch die Untersuchung der verschiedenen Eitersorten wäre bequem durchzuführen, da der Nachweis von Albumose noch sicher bei 1-proc. Gehalt gelingen müsste (p. 58).

Auch der von DRÜNER (III, p. 324) beschriebene Kernparasit bedarf, da das fällungskräftige Sublimat benutzt wurde, wohl einer Con-

trole auf Grund des hier Mitgetheilten, besonders da Drüner auch färbungsanalytisch fabulirt. Die Karyolyse Drüner's scheint mir ebenso problematisch wie Rabl's Karyophthise (vergl. p. 191).

Kapitel II. Die Gerüst- und Filartheorie.

Ebenso wie die Granulalehre beschäftigen sich auch diese Theorien nur mit Fällungsstructuren, nicht in dem Sinne, dass sie nur Fällungsartefacte behandeln, sondern desshalb, weil die Eiweisskörper nur im Zustande der Fällung gerüstig oder fädig oder granulär sich abscheiden. Alle diese Theorien geben nur über eine Seite in der Lebensthätigkeit des Protoplasmas Aufschluss, sie sind gewissermaassen eine Morphologie der Fällungsprocesse im Protoplasma. Es mag hier nochmals auf die Bemerkung Berthold's (I, p. 175) verwiesen werden, dass die „fadenförmigen Differenzirungen, welche in der Grundmasse des Protoplasmas auftreten, Gebilde mehr oder weniger fester Natur sein dürften. Vielleicht haben wir es in ihnen oft mit Flocken ausgeschiedener Eiweisssubstanzen zu thun, ausgeschiedenen Fibrinflocken vergleichbar. Möglicherweise gehören manche jener Bildungen hierher, die Flemming neuerdings in Zellen von Salamandra, Frosch, Katze, Toxopneustes u. s. w. gefunden und auf der ersten Tafel seines bekannten Buches verschiedentlich abgebildet hat". So weit Berthold, dem ich mich hier ganz anschliessen möchte, auch darin, dass, wie schon p. 276 erwähnt wurde, durch Fixirungsmittel solche Gerüst- und Fadenbildungen neben den bereits in der lebenden Zelle vorhandenen neu erzeugt werden können. Aber auch in den vitalen gerüstigen und fädigen Structuren vermag ich nicht wie Flemming die eigentliche und wahre Grundstructur zu sehen, sondern nur das Sinnbild von chemischen Processen, die zur Fällung von Eiweisskörpern führen. Solche Fällungen erhalten sich nach p. 217, 288 durch Fixirungsmittel ganz naturgetreu, sobald nicht neben ihnen in der formlosen Flüssigkeit des Plasmas Eiweisskörper gelöst sind. Diese müssen unfehlbar granulär oder gerüstig von den Fixirungsmitteln ausgefällt werden und das ursprüngliche Bild verwischen. Durch Aneinanderreihung kleiner Fällungsgranula zu kürzeren Fädchen oder verzweigt fädigen Aggregaten müssen auch solche isolirte Filargebilde entstehen, wie Flemming oft beschreibt. Erst vor kurzem hat Flemming (XVII, p. 483, Anm. 1) gesagt: „Ich sehe davon ab, dass solche (d. h. Fibrillen) vielfach und vielleicht überhaupt aus aneinandergereihten Körnchen bestehen können, wodurch ihrer fädigen Form ja kein Eintrag geschieht." Hierzu bitte ich besonders auch Flemming's (XVII) Fig. 17 auf Taf. V (Kaninchenei, Osmiumfixirung) zu vergleichen. Als bestes Beispiel für eine filare oder fibrilläre Fällungsform aller Eiweisskörper verweise ich auf die ausführlich besprochenen Strahlungen im Hollundermark, denen die protoplasmatischen Strahlungen gleichen wie ein Ei dem anderen.

Auch diejenige Fadenbildung, die Flemming sicherlich zur Verallgemeinerung seiner Filartheorie veranlasst hat, der Kernknäuel, ist doch nur ein polymorphes Zwischenglied zwischen den granulaartigen, isolirten Chromosomen, die sicher nicht filar sind, und dem ruhenden Kerngerüst, das sicher oft gerüstig gebaut ist, oft aber auch, z. B. nach Pikrinsäure oder Alkoholfixirung, zweifellos schaumig-vacuolig

conservirt wird. So fand ich die ruhenden Kerne in Wurzelspitzen von Vicia nach der genannten Fixirung, während dasselbe Object durch HERMANN'sche oder FLEMMING'sche Lösung, durch Sublimat und andere scharfe Fällungsmittel unverkennbar gerüstig war. Da durch BÜTSCHLI's Vorgang man allmählich an den Gerüsten irre zu werden beginnt und sie alle für verkannte Wabenstructuren zu betrachten sich zwingt, so muss darauf noch näher eingegangen werden. Ich verweise desshalb auf die Kritik der Wabenlehre, wo sich zeigen wird, dass Gerüststructuren wirklich vorkommen. So riesenschlangenartige, die ganze Zelle durchsetzende Fadenbildungen, wie CAMILLO SCHNEIDER (I, Taf. I u. II) abbildet, habe ich, abgesehen von den Kernknäueln der Sexualzellen bei den Monocotyledonen, nicht gesehen. SCHNEIDER's ganze Darstellung, auf die ich hier nicht näher eingehen kann, ist wohl nicht frei von schematisirenden Phantasmen. Aehnlich urtheilt auch BÜTSCHLI (III, p. 117, 118). Auf diesen Autor möchte ich auch betreffs der alten Gerüsttheorien HEITZMANN's und FROMMANN's verweisen (vergl. BÜTSCHLI, III, p. 102—114), um oft schon Dargestelltes nicht nochmals zu wiederholen.

Unter Bezugnahme auf das Kapitel über Granula und Gerüste aus gefällten Eiweisskörpern (p. 279) sind noch im Zusammenhang die Einwände zu besprechen, welche FLEMMING (V, p. 704—706) gegen die Behauptung, die Kerngerüste fixirter Präparate seien ganz oder theilweise Artefacte, als stichhaltig vorgebracht hat.

Der erste Punkt, die Gleichmässigkeit der Anordnung und Maschenweite, ist schon p. 282 erledigt worden. Es wäre nur hinzuzufügen, dass die Gerinnungsgerüste ebenso engmaschig werden können, wie die engsten Kernnetze. Dass der Kerninhalt stets netzartig und nicht auch homogen, wie das Fibrin zuweilen, gerinnt, spricht keineswegs dafür, dass die Kerngerüste nur vitalen Ursprunges sein können, denn Fibrin und Kerninhalt sind verschiedene Eiweisskörper, die je nach Concentration und chemischer Reaction sich ungleich verhalten werden.

„Zweitens" sagt FLEMMING (V, p. 706), „kommt die constante Lage der Kernkörper in den Balken des Gerüstes in Betracht. Bei Gerinnungen würde zu fragen sein, warum dieselben gerade immer, auch wo die Netze lockerer sind, in den Fäden des Gerinnsels eingeschlossen werden müssten". Es ist zu antworten: weil jedes fremdartige Gebilde, also auch die Nucleolen, als Ansatzstellen für die gefällten Theilchen dienen müssen. (Man vergl. auch p. 275.)

Drittens ist es nach FLEMMING schwer einzusehen, „warum die Balken eines blossen Gerinnsels sich an gewissen Stellen anders wie an anderen" gegenüber der Anilinfärbung verhalten sollen. Die physikalische Theorie der Färbung beantwortet diese Frage leicht.

Damit sind die Einwände FLEMMING's erschöpft. Dass sehr viele Fixirungsmittel, gelegentlich alle, gerüstige Gerinnsel ausfällen müssen, wenn Eiweisskörper in dem Protoplasma gelöst sind, kann nicht bezweifelt werden.

Kapitel III. Die Wabentheorie.

Um BÜTSCHLI's Anschauungen über den Bau des Protoplasmas richtig verstehen und würdigen zu können, ist es nothwendig, sich daran zu erinnern, dass er (III, p. 1, 2) schon im Jahre 1878 die

Netzbilder des Protoplasmas, die zur Gerüsttheorie geführt hatten, nur als optische Durchschnittsbilder eines wabigen Baues auffasste und seitdem diese Frage nicht aus dem Auge verlor. Nachdem Bütschli die „frappante Aehnlichkeit“ (III, p. 58) künstlicher Oelseifenschäume mit dem Plasma bekannt geworden war, hat er die Wabentheorie nicht bloss auf dieses, sondern in seinem allerneuesten Werk (IV) auch auf zahlreiche andere Objecte ausgedehnt, immer bemüht, die Wabenstructur auch hier wiederzufinden.

Bevor ich auf diese neueren Versuche, soweit sie die Protoplasmastructur und den Begriff der Wabe betreffen, näher eingehe, möchte ich mir eine bereits auf p. 276 angedeutete historische Bemerkung erlauben. Bütschli (III, p. 97, Anmerk. 1) behauptete, dass seines Wissens niemand vor ihm den Gedanken „ernstlich vertreten“ habe, dass die „so vielfach geschilderten Netzstructuren des Plasmas als wabige oder schaumige aufzufassen seien“. Bereits im Jahre 1851 hat Mohl (I, p. 44) gesagt: „Es verhält sich das Protoplasma zum Zellsaft, wie eine schäumende Flüssigkeit zu Luft.“ Es würde also sicherlich die Priorität Mohl zuzuschreiben sein, soweit es sich um feiner oder gröber vacuolisirtes, schaumiges Protoplasma handelt, dessen echte Schaumstructur auf den ersten Blick ja einleuchtet und, wie schon p. 276 erwähnt, zuweilen nur fälschlicher Weise als gerüstig bezeichnet worden ist. Bütschli geht nun aber zweifellos über Mohl hinaus, indem er einen allgemeinen wabigen Bau des Protoplasmas auch dort annimmt, wo dieses homogen oder dem unbefangenen Auge wirklich gerüstig erscheint. Neben den grösseren und kleineren Vacuolen soll nach Bütschli alles Protoplasma noch aus winzigen Waben aufgebaut sein, und dieses winzige Wabenwerk sei erst die eigentliche Elementarstructur des Protoplasmas. Die Grösse dieser Elementarwaben, die z. B. in den Leberzellen des Frosches und Kaninchens (III, p. 91) eine durchschnittliche Weite von 1 μ haben, wiederholt sich nach Bütschli an den heterogensten Objecten, z. B. durch Chromsäure oder Alkohol geronnener Gelatine (IV, p. 154, 171), coagulirtem Hühnereiweiss (IV, p. 63), Sphärokrystallen von Inulin (IV, p. 90), Stärkekörnern (IV, p. 304) und vielen anderen; weniges nur um 1 μ schwankend, etwa von 0,5—1,5 μ. Gerade diese Uebereinstimmung in der Wabengrösse betont Bütschli wiederholt als ein Zeichen dafür, dass diese winzigen Waben ein elementares Structurelement seien, von „ähnlicher Verbreitung und Bedeutung wie der Aufbau der höheren Organismen aus Zellen“ (III, p. 2). Mit anderen Worten, die Elementarwabe des Protoplasmas wäre der Elementarorganismus, ähnlich den Bioblasten der Granulatheorie.

1. Wabe, Globulit und Gerinnungsschaum.

Das Bestreben, die wabige Elementarstructur an den mannigfaltigsten Objecten nachzuweisen, veranlasst Bütschli, etwas freigebig mit dem Worte Wabe zu sein und es oft auch dort anzuwenden, wo schon die ganze Entstehungsart des Objectes eine Wabenstructur unmöglich erscheinen lässt. So wird wohl ausser mir auch mancher andere Leser erschrecken, wenn (IV, Taf. XXIV, Fig. 3) auf dem Objectträger auskrystallisirtes Kaliumbichromat in der Figurenerklärung mit dem Prädicat versehen wird: „Wabenbau sehr schön“

Von derselben Figur berichtet der Text (IV, p. 101) viel sachgemässer: „Es handelt sich bei ihnen um eine, von einem Punkte (links oben in Fig. 6) ausgehende und in ihrer Natur vorwiegend strahlige Gerüstbildung[1]), bei welcher die Strahlen mehr oder weniger den Charakter zarter krystallitischer Fäden oder Strahlen angenommen haben. Ueberall aber lässt sich deutlich erkennen, dass sie durch Querverbindungen zu einem Gerüstwerk[1]) vereinigt sind, dass es sich also, wie bei den seither betrachteten Sphären von rein strahligem Bau, um ein maschiges Gerüstwerk[1]) handelt, in welchem der radiär-strahlige Charakter vorherrscht."

Ein Gerüstwerk hat doch aber sicherlich keinen „sehr schönen" Wabenbau, ist überhaupt nicht wabig. Will Bütschli hier nur zeigen, dass auch Gerüstwerke einen wabigen Eindruck machen können? Dieselbe Frage taucht auf, wenn Fig. 2, Taf. VII (eingetrocknete Pikrinsäure) in der Figurenerklärung als „deutlich wabig" bezeichnet wird, der Text (IV, p. 102) aber bemerkt, dass hier „der netzig-gerüstartige" Bau nicht in Zweifel gezogen werden kann.

Da Bütschli's ganze Theorie gerade auf der subtilen Unterscheidung sehr engmaschiger Gerüstwerke von ebenso engmaschigen Wabenwerken beruht, so wäre, um Missdeutungen vorzubeugen, eine strengere Ausdrucksweise wohl vortheilhaft gewesen.

Um die Wabenlehre zu retten, hat Bütschli noch eine andere Bezeichnung geschaffen: globulitisch-wabig. So sind (IV, p. 141) „die wabigen Structuren der krystallisirenden Substanzen" nicht echte Schäume, sondern sie sind globulitisch-wabig, hervorgegangen aus der Vereinigung „äusserst feiner, in lebhafter Molecularbewegung tanzender Globuliten", die zuerst sich abscheiden. Globulitisch-wabig sind ausserdem gebaut Gerinnungsschäume aus stark verdünnten Lösungen von flüssiger Gelatine (IV, p. 43), die ein „aus erstarrten und mehr oder weniger zusammenhängenden bis verschmolzenen Tröpfchen bestehendes Gerinnsel geben", ferner gewisse Bezirke geronnener Harze (IV, p. 79), wo „in ein und demselben Präparat Partien mit schönen Schaumstructuren und solche mit dichter Globulitenbildung nebeneinander" vorkommen. In einer nachträglichen Anmerkung (IV, p. 383) heisst es sogar, dass sehr stark verdünnte Gelatinelösung durch Alkohol flockig-gerinnselig gefällt wird und es sei ganz klar, „dass es sich in diesem Falle um wirkliche Netzgerüste handelt, deren Maschen schwammartig und allseitig mit einander communiciren". Wenn diese Netzwerke sehr fein sind, dann ist eine „Zusammensetzung aus Globuliten häufig nicht mehr zu erkennen".

Man wird schon aus diesen wenigen Beispielen erkennen, dass globulitisch-wabig ein Verlegenheitsausdruck für gerüstig oder schwammig, d. h. nicht-wabig ist. Als Globuliten bezeichnet Bütschli nach dem Vorgange der Krystallographen die ersten sichtbaren Theilchen eines Niederschlages, die anfangs flüssige Tropfen sind und je nach Substanz, Lösungs- und Fällungsmittel bald eher, bald später erstarren und zu dem werden, was in dieser Arbeit als Granulum, Kügelchen etc. bezeichnet wird. Zuerst entstehen stets Vollglobuliten, während jene kleinen Hohlkörperchen, die Bütschli beim kohlensauren Kalk (IV, p. 116, 117), beim Inulin (IV, p. 85—87) etc. so oft zu mannigfach gestalteten Aggregaten wabigen Aussehens sich

1) Der gesperrte Druck ist von mir veranlasst.

vereinigen sah, secundäre Bildungen sind, die, wie ich noch zeigen werde, aus den primären Vollglobuliten hervorgehen.

Zunächst ist es aber nöthig, zu bestimmen, welches Bild entsteht, wenn erstarrte Vollglobuliten in dichter Berührung sich mehrschichtig zusammenlagern. Das kann einerseits dadurch veranlasst werden, dass eine milchig-trübe Globulitenfällung eintrocknet, oder dass, wie bei erstarrter Gelatine, die Globuliten sogleich bei der Fällung dicht zusammengehalten werden. Wenn man starre Kugeln von gleichem Durchmesser sorgfältig über einander schichtet, so bleiben kleine geschlossene Lücken übrig, deren Durchmesser etwas weniger als $^1/_3$ des Kugeldurchmessers beträgt. Solche ideale Verhältnisse kann man freilich mit globulitischen Fällungen nicht erreichen, wohl aber annähernd nachahmen. Lässt man z. B. die schön granuläre Fällung von Platinalbumose in dichter Aufschwemmung auf ein Deckglas eintrocknen, so bekommt man einen Ueberzug, der durchsetzt wird von solchen kleinen Lücken oder Zwickeln, die, mit Luft gefüllt, ein mikroskopisches Bild geben, das in Bütschli's neuestem Werk oft wiederkehrt und als wabig bezeichnet wird. Die Zwischenräumchen zwischen den Granulis müssen zwar, da diese vorherrschend gleich gross sind, ebenfalls gleich gross sein, verdienen aber die Bezeichnung Wabe keineswegs und können nicht den Schaumwaben gleich gesetzt werden. Statt der Albumosegranula kann man auch die p. 321 zu beschreibenden prachtvollen Globuliten, die Pikrinsäure aus verflüssigter Gelatine fällt, antrocknen. Da diese Globuliten nicht ganz fest werden, sondern weich, gallertartig bleiben, so schmiegen sie sich noch enger an einander an, die Zwickel können hier noch enger und feiner, „elementarwabiger" werden, die einzelnen Globuliten sind kaum oder gar nicht mehr zu erkennen. Wir wollen diese kleinen Räumchen fernerhin kurz als Zwickelwaben bezeichnen. Ihre Grösse muss auf 0,5—1,5 μ herabsinken, wenn entsprechend kleine Globuliten sich zusammenlagern. Sobald diese aber zunächst in Kettchen oder hefesprossenähnliche Verbände sich vereinigen und alles das erst schliesslich zu einem zusammenhängenden, lockeren Ganzen sich absetzt, so muss dieses gerüstig gebaut sein. Das konnte Bütschli nicht übersehen und so musste er versuchen, aus Vollglobuliten doch noch ein Wabenwerk sich entwickeln zu lassen. Er schreibt den Globuliten (IV, p. 142) die Neigung zu, „bei ihrer Verschmelzung oder Verwachsung" „kämmerchenartige Hohlräume" zu umschliessen, fügt aber bei: „Es wird schwer sein, für diese Neigung der Globuliten zu maschiger Gruppirung unter Einschluss von Hohlräumchen eine Erklärung zu finden. Doch beobachtete ich gelegentlich beim Eintrocknen von in Wasser fein vertheilten Karmin- oder Stärkekörnehen, dass auch diese eine grosse Neigung haben, sich zu feinen Maschennetzen zusammenzuordnen" (Bütschli, IV, p. 142). Zugleich verweist Bütschli auf die Fällungen sehr verdünnter Lösungen von Gelatine, Gummi, Collodium, wo es ebenso sei. Im Nachtrag, der diese Objecte behandelt, heisst es von der Gelatine (IV, p. 383): „Es ist ganz klar, dass es sich in diesem Falle um wirkliche Netzgerüste handelt, deren Maschen schwammartig und allseitig mit einander communiciren." Bütschli beschreibt hier dasselbe, was oben p. 281 und p. 288 von der Entstehung der Fällungsgerüste im Hollundermark beschrieben wurde. Ein solches allseitig communicirendes Lückensystem ist aber mit „kämmerchenartigen Hohlräumen" nicht recht verträglich, denn „kämmerchenartig" erweckt

doch durchaus die Vorstellung isolirter geschlossener Räumchen. Es mag aber der etwas freiere Ausdruck so verstanden werden, dass gewisse Abschnitte des Lückensystemes dadurch kämmerchenartig werden, dass sie durch recht enge Kanälchen nur mit den Nachbarn communiciren, wirkliche Waben sind sie aber noch nicht. Das setzt auch Bütschli voraus, dem wir nun (IV, p. 142) nochmals das Wort lassen: „Da nämlich die Globuliten ursprünglich zähflüssig sind, so werden die sich berührenden, welche die Wand eines kämmerchenähnlichen Hohlraumes bilden, allmählich verschmelzen, was schliesslich, wenn die Globuliten dicht zusammengelagert sind, zur Bildung einer geschlossenen Wand um das Kämmerchen führen muss, wenn dazu die nöthige Zeit vor der Erstarrung der Globuliten bleibt. Das von Globuliten umschlossene Kämmerchen kann sich demnach auf diese Weise in eine wirkliche Wabe verwandeln.“ Ich schlage vor, um für die lange Beschreibung ein kurzes Wort zu haben, eine so entstandene Wabe als Verschmelzungswabe zu bezeichnen, im Gegensatz zu den echten, durch Entmischung entstehenden Schaumwaben. Die Verschmelzungswabe kann aber nach Bütschli's eigener Ansicht nur entstehen, wenn die flüssigen Globuliten nicht zu schnell erstarren. „Da nun“ (B., IV, p. 142) „die Erstarrung in der Regel sehr rasch vor sich geht, so wird es auch häufig nicht zur Bildung ganz abgeschlossener Hohlräumchen kommen, vielmehr werden die benachbarten Räumchen vielfach durch feine Lückenräume zwischen den nicht völlig verschmolzenen Globuliten zusammenhängen.“ Das heisst doch aber mit anderen Worten: das zunächst entstandene „wirkliche Netzgerüst“ bleibt bestehen und wird nicht wabig, auch nicht einmal globulitisch-wabig.

Ja, die Neigung zur Bildung von Verschmelzungswaben ist noch viel kleiner, als Bütschli eingesteht. Denn in dem flockigen Gerinnsel stark verdünnter Gelatinelösung (gefällt mit Alkohol, B., IV, p. 383) findet man „alle Uebergangsstufen“ von „Vereinigungen weniger Tröpfchen oder Globuliten zu fadenartigen bis verzweigten Verbänden“ bis zu „umfangreichen Netzwerken“. Die Stufenfolge, die ich schon p. 281 beschrieben hatte, ist also: einzelne Globuliten, Pärchen davon, kurze Ketten, hefesprossähnliche Aggregate und zuletzt erst die Netztgerüste. In Hollundermarkzellen beobachtet man bequem, dass aus Casein, Albumin, Globulin u. dergl. zuerst isolirte, molecular tanzende Globulitchen ausfallen, die aneinander hängen bleiben, zuerst also Kettchen oder schwach verzweigte kurze Verbände bilden, die schliesslich infolge des dichten Gedränges zu den Gerüsten sich zusammenlegen. Es entstehen hier oft sehr weitmaschige Gerüste (Fig. 12, 20), mit so grossen „kammerähnlichen“ Räumen, dass niemals Verschmelzungswaben sich entwickeln können. Aber selbst wenn infolge höherer Concentration der Eiweisslösung die Globuliten sogleich dicht sich drängen, so bleiben doch die Zwischenräume alle in Communication, wenngleich ihr Durchmesser auf ca. 1 μ herabsinkt. Das engmaschige Gerinnsel ist und bleibt ein Juxtapositions-Gerüst, denn die Globuliten erstarren, wenn das Fällungsmittel in ausreichender Menge vorhanden ist, sicherlich so schnell, dass sie nicht vorher zu geschlossenen Wabenwänden verschmelzen können.

Aber auch die Hohlglobuliten und das an sie sich Anknüpfende bedürfen noch einer Berichtigung. Ich habe keine Stelle finden können, die deutlich Bütschli's Ansicht über die Entstehung dieser hohlen

Gebilde ausdrückte. Da ich die Stelle übersehen haben könnte, so muss ich mich darauf beschränken, meine eigene Anschauung hierüber zu entwickeln. Viele Fällungen sind im Ueberschuss des Fällungsmittels wieder löslich, z. B. die Tanninfällung der Albumose (p. 290); umgekehrt verschwindet ein mit zu geringer Menge des Fällungsmittels erzeugter Niederschlag oft wieder, weil er im Ueberschuss der Lösung sich wieder löst. Endlich, und das würde für die Hohlkugeln aus kohlensaurem Kalk gelten, kann sich die Löslichkeit ändern, der Kalk (vergl. Ostwald, II, p. 1042) ist als tropfiger Globulit in Wasser löslich, als Krystall nicht mehr. Kurz es gibt bei Fällungsversuchen verschiedene, oft schwer zu vermeidende Ursachen dafür, dass eben erst entstandene Vollglobuliten sich lösen. Dann müssen aber stets vorübergehend Hohlglobuliten oder Ringgranula entstehen, aus folgendem Grunde. Es vergeht stets zwischen der Fällung und der secundären Lösung eine, wenn auch noch so geringe, Zeit, während der, um es etwas mystisch auszudrücken, die Tendenz zur Unlöslichkeit in die zur Löslichkeit umschlägt. Was zuerst gefällt wurde, wird natürlich auch zuerst wieder sich lösen. Die Globuliten, mögen sie noch so klein sein, wachsen doch sicher aus noch kleineren, zunächst unsichtbaren Anfängen, an die sich peripherwärts neue Theilchen anlegen, heran. Das Centrum aller Globuliten ist also der am längsten gefällte Theil, der am ersten sich wieder lösen wird. Desshalb erscheint zunächst ein winziges, punktförmiges Hohlräumchen im Centrum, das allmählich, in dem Maasse, in dem die Lösung peripherwärts immer jüngere Fällungszonen erfasst, sich ausdehnt, bis ein unverkennbares Hohlgebilde oder Ringgranulum entstanden ist, das aus einer Wabe besteht. Wir wollen diese neue Sorte als Lösungswaben bezeichnen. Zu ihnen gehören alle von Bütschli beschriebenen hohlen Globuliten, durch deren Vereinigung, wenn die weitere Lösung aufhört, grössere Gebilde von wabigem Bau entstehen.

Man muss also in Bütschli's Darstellung vier Arten von Waben sehr ungleicher Entstehung unterscheiden: Schaumwaben, Lösungswaben, Verschmelzungswaben und Zwickelwaben. Den Ausgangspunkt für Bütschli's ganze Untersuchung bilden die Schaumwaben und deren Aehnlichkeit mit Protoplasmastructuren. Nur wenn die drei anderen Wabenarten aus denselben Gründen sich entwickelten wie die Schaumwaben, würde Bütschli's Streben, allüberall Waben und damit eine übereinstimmende Elementarstructur nachzuweisen, eine fundamentale Bedeutung beanspruchen können. Da aber Lösungs-, Verschmelzungs- und Zwickelwaben ganz heterogenen Ursprunges sind und nur in der äusseren Erscheinung mit den Schaumwaben übereinstimmen, so ist man nicht berechtigt, sie alle zusammenzuwerfen und als gleichwerthige Grundlagen einer Theorie zu benutzen. Einer Theorie, die obendrein durch die Bezeichnung globulitisch-wabig, das nur ein Deckwort für gerüstig ist, sich über mancherlei Lücken hinweghelfen muss.

Auch der Begriff der Gerinnungsschäume (B., IV, p. 32) ist der Theorie zu Liebe auf Objecte übertragen worden, für die er nicht passt. Schon sonderbar berührt es, dass nur die concentrirten Lösungen der betreffenden Stoffe, z. B. Gelatine, Eiweiss, ferner arabisches Gummi und anderes, einen Gerinnungsschaum, als sichtbares Zeichen des sich abspielenden Entmischungsvorganges, liefern, dass es aber „sicher“ ist (IV, p. 43), dass stark verdünnte Lösungen

„ein fein globulitisches Gerinnsel, d. h. ein aus erstarrten und mehr oder weniger zusammenhängenden bis verschmolzenen Tröpfchen bestehendes Gerinnsel geben", also doch eine gerüstige Structur. Eine einfache Fällung, z. B. von Eiweiss durch Chromessigsäure oder Pikrinschwefelsäure (IV, p. 61), wobei doch sicherlich eine neue, in der Reactionsflüssigkeit unlösliche, chemische Verbindung entsteht, kann doch nicht als Entmischungsvorgang aufgefasst und mit der Oelseifenschaumbildung auf eine Stufe gestellt werden. Ebensowenig ist doch eine rein physikalische Fällung, wie die des arabischen Gummis durch Alkohol, ein mit der Schaumbildung vergleichbarer Process; ebensowenig die Coagulation des Eiweisses durch Hitze. Ich kann nur ein gemeinsames Band für alle diese Processe finden, nämlich das, dass die hierbei entstehenden Niederschläge wabig gebaut sein sollen, was aber, wie die folgenden Kapitel zeigen werden und bereits theilweise gezeigt wurde, gar nicht zutrifft.

2. Gelatine.

Auf Bütschli's Versuche mit Gelatine möchte ich noch näher eingehen, um an einem seiner bevorzugtesten Objecte meine abweichenden Anschauungen zu entwickeln und die Gründe darzulegen, die mich hier abermals in Widerspruch mit Bütschli setzen.

1. Gerinnungsschäume.

Bütschli verwendete 10—25-proc. Gelatine und behandelte sie $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang mit Chromsäure (0,3—0,5-proc.), Gerbsäure, Alkohol, auch Schwefeläther, nachdem sie, in dünner Schicht auf Deckgläser aufgetragen, erstarrt war. Nach Bütschli (IV, p. 148) rufen die genannten Reagentien eine „Art Gerinnung" hervor, nicht eine wirkliche Gerinnung, sondern nur „das Sichtbarwerden einer in der Gallerte schon vorhandenen Structur, die sich bei der Erstarrung gebildet hat". Die Elementarwaben der erstarrten Gelatine sollen also gewissermaassen nur verdeutlicht werden. Das gelingt nicht mit Kaliumbichromat (IV, p. 148, Anmerk. 2), nicht oder sehr schlecht mit Pikrinschwefelsäure.

Da Leime noch eine Anzahl derjenigen Fällungsreactionen geben, welche die Eiweisskörper auszeichnen (vergl. Neumeister, III, p. 47, 48), so ist zu vermuthen, dass die „Art Gerinnung" eine wirkliche Fällung sein könnte, was sicher zunächst für die Gerbsäure zutrifft. Bütschli hat seine zahlreichsten Versuche mit Chromsäure und Alkohol angestellt, deren etwaige Fällungswirkung auf Gelatine zunächst hätte geprüft werden müssen. Statt dessen bekennt Bütschli (IV, p. 150): „Ohne genauere Untersuchungen über die Wirkung der verdünnten Chromsäure auf die Gelatinegallerte angestellt zu haben, bin ich doch geneigt, anzunehmen, dass dieselbe keine sehr tiefgreifende sein kann, sondern sich wesentlich darauf beschränken muss, dass dem Gelatinegerüst Wasser entzogen wird, wodurch es stärker lichtbrechend und sichtbar wird; die Wirkung wäre daher nicht wesentlich verschieden von der des Alkohols." Dagegen heisst es später (IV, p. 189): „Die Einwirkung der Chromsäure auf die Gelatine muss von tiefer gehenden Umänderungen begleitet sein, wie die des Alkohols, was schon aus der bekannten Thatsache hervorgeht, dass chromsaure Salze am Licht die Gelatine in Wasser unlöslich machen." Da für

Bütschli (IV, p. 188) erstarrte wässerige Gelatinegallerte ein „fester Körper“ ist, so hält er es wohl desshalb für ausgeschlossen, dass mehr als eine Wasserentziehung den Reagentien zuzumuthen sei. Erstarrte Gelatine ist aber kein fester Körper, sondern ein merkwürdiger Zwitterzustand, der z. B. Salzlösungen unbehindert, mit derselben Geschwindigkeit wie in reinem Wasser (Ostwald, II, p. 687) diffundiren lässt und auch andere Eigenschaften einer Flüssigkeit beibehalten hat, daneben Anklänge an feste Körper zeigend. Es war daher zweifellos, dass die erstarrte Gelatine noch dieselben Fällungsreactionen geben würde, wie die flüssige, und dass solche Vorgänge bei Bütschli's Versuchen eingriffen.

I. Einige Fällungsreactionen verflüssigter, noch erstarrungsfähiger Gelatine, derselben, die später auch erstarrt untersucht wurde. Ich bitte das zu beachten, damit man nicht an die auch von Bütschli (IV, p. 54) behandelte β-Gelatine, die nicht mehr gelatinirt, denkt. Eine 15-proc., verflüssigte Gelatine von schwach saurer, ursprünglicher Reaction wurde nicht gefällt von Kaliumbichromat (2,5-proc.), Osmiumsäure, Sublimat (1-proc.), Essigsäure (verdünnt und concentrirt): das Chromat und Osmiumsäure gaben erst einen Niederschlag, wenn mit Essigsäure gut angesäuert worden war. Pikrinschwefelsäure fällt nicht, sicher desshalb, weil die Schwefelsäure des Gemisches den von der Pikrinsäure angestrebten Niederschlag verhindert. Gute Fällungsmittel sind reine Pikrinsäure, Chromsäure (0,25—5-proc.), Alkohol, Gerbsäure (2-proc.). Alle diese Reagentien erzeugen aber nur mit grossem Ueberschuss einen bleibenden Niederschlag, während durch einige Tropfen erzeugte Trübungen auch in der bereits abgekühlten, aber noch flüssigen Gelatine schnell wieder verschwinden. Durch grosse Ueberschüsse des Fällungsmittels erzeugte Niederschläge sind frisch im Ueberschuss von Gelatine vollkommen und leicht löslich. Diese für die weitere Darstellung sehr wichtige Thatsache ist aber noch weiter zu zergliedern, zunächst an der Pikrinfällung.

Die milchige, erkaltet vollkommen wässerig-flüssige Pikrinfällung löst sich sehr leicht in kaltem Wasser, auch nachdem sie 20 Stunden und viele Tage in der Pikrinsäure gestanden hat. Die neue Verbindung, das Gelatinepikrat, hat also eine ganz neue, der Gelatine an und für sich fremde Eigenschaft angenommen. Die Lösung beginnt aber schon, wenn die Pikrinsäure noch nicht ganz ausgewaschen ist, d. h. das Gelatinepikrat ist schon in stark verdünnter Pikrinsäure ebenso löslich, wie in Wasser. Verdünnt man statt mit Wasser mit verflüssigter Gelatine, so löst sich die Pikringelatine also desshalb, weil diejenige Pikrinsäuremenge, die zum Bestehen des Niederschlags erforderlich war, nicht mehr vorhanden ist, denn das Wasser der Gelatine hat die Pikrinsäure verdünnt, bei genügendem Zusatz so weit, dass der ganze Niederschlag anscheinend im Ueberschuss der Gelatine sich löst. Ganz ohne Einfluss ist aber auch die neu hinzugefügte Gelatine als solche nicht. Denn sie reisst von der noch nicht an gefällte Gelatine gebundenen Pikrinsäure neue Theile an sich, wodurch diese ebenfalls noch weiter verdünnt und für die Lösung des Niederschlags geeignet wird.

Die Chromsäure, als Hauptreagens Bütschli's, verlangt eine ausführliche Besprechung, die sich auf verschiedene Concentrationen der Säure und Gelatine und auf die Fällungsformen erstrecken muss.

Eine 2-proc., verflüssigte Gelatine wird von 0,1-proc. Chromsäure gar nicht gefällt, selbst von dem grössten Ueberschuss nicht. Hiervon überzeugt man sich leicht dadurch, dass ein Tropfen Gelatine auch in viel 0,1-proc. Chromsäure gar keine Trübung hervorruft. Gut fällen 0,25-, 0,5-, 1-, 2,5- und 5-proc., um so schneller und besser, je concentrirter sie sind, aber alle diese Fällungen sind im Ueberschuss von Gelatine wieder löslich. Umgekehrt trüben schon wenige Tropfen der Gelatine grosse Volumina der verschiedenen Chromsäurelösungen dauernd, ein Ueberschuss von Chromsäure, selbst der 5-proc. löst also die Chromgelatine nicht wieder auf. Ebenso verhielt sich eine 15-proc. Gelatine, nur dass sie von den Chromsäurelösungen entsprechend grössere Volumina verlangte, eine vollständige Ausfällung sogar sehr viel erfordert haben würde, was nicht geprüft wurde. Denn 15-proc. Gelatine ist schon eine sehr concentrirte Lösung für ein Colloid und braucht daher schon zur Erzeugung eines bleibenden Niederschlags das doppelte bis dreifache Volumen einer 0,5-proc. Chromsäure. Noch mehr verlangt 40-proc. Gelatine, die aber sonst keine Abweichungen gibt.

Die frische gefällte Chromgelatine ist in kaltem Wasser leicht löslich, verliert aber schon nach kurzer Zeit, sicher nach 1—2 Stunden diese Eigenschaft, bleibt aber äusserst quellbar in Wasser. Unzweifelhaft ist aber die frisch gefällte Chromgelatine ein äussert labiler Körper, der in kaltem Wasser, im Ueberschuss von Gelatine und auch in verdünnterer Chromsäure sich zu lösen strebt. Noch verwickelter werden die Erscheinungen dadurch, dass verschiedene Chromverbindungen der Gelatine zu bestehen scheinen, die um so unfähiger wird zu erstarren, je höher ihr Chromgehalt steigt. Hier ist eine so bunte Mannigfaltigkeit möglich, dass es zu weit führen würde, alle einzelnen Fälle auszumalen.

Alle fällungskräftigen Concentrationen der Chromsäure (0,25—5-proc.) trüben zunächst die verflüssigte Gelatine durch Vollglobuliten, die anfangs noch flüssig sind und nun in dem Maasse um so schwerer erstarren, je mehr Chromsäure sie enthalten, je concentrirter also im Allgemeinen die verwendete Chromlösung war. Es mögen als besondere Beispiele noch 0,5- und 5-proc. Chromsäure dienen. Die mit 0,5-proc. aus 15-proc. Gelatine gefällten Vollglobuliten (Granula, Kügelchen), frisch in kaltem Wasser leicht und schnell löslich, quellen, wenn sie $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde unter Chromsäure gestanden haben, nur noch stark, bis zur Unkenntlichkeit in Wasser, sie sind erstarrt. Durch neue Chromsäure schrumpfen die stark gequollenen Globuliten wieder auf ihre ursprüngliche Grösse ein. Wenn aber die ganz frische Fällung mit Wasser behandelt wird, so werden die Globuliten löcherig, lösungswabig, die kleinsten verwandeln sich in Ringgranula oder einwabige Hohlglobuliten, die grösseren werden mehrwabig, oft äusserst eng und feinmaschig, ganz den sog. Elementarwaben Bütschli's entsprechend. Endlich verschwinden die verblassenden Gebilde ganz im Wasser.

Eine 1-proc. Chromsäure bewährt sich, im Uebrigen wie 0,5-proc. wirkend, als die stärkere dadurch, dass die von ihr gefällten Globuliten überhaupt quellbarer sind, als die mit 0,5-proc. erzeugten. Näher auf diese Frage komme ich bei der Fällung erstarrter Gelatine zurück, nur so viel sei vorausgeschickt, dass schon in der mit Chromsäure gefällten Gelatine, also in der Reactionsflüssigkeit die zuerst als winzige Kügelchen ausgeschiedenen Globuliten um so mehr aufquellen, je

höher die Concentration der Chromsäure steigt. Endlich wird mit 5-proc. Chromsäure annähernd der Höhepunkt dieser, schon bei zehnfacher Verdünnung bemerkbaren Wirkung erreicht. Die Gelatine hat nicht bloss ihr Erstarrungsvermögen en gros verloren, sondern auch die einzelnen Globuliten können nicht mehr erstarren und fangen, kaum gefällt, schon wieder an sich zu lösen, dabei grobschaumig werdend. Wenn nach einigen Stunden die Fällung im Reagenzrohr sich gesetzt hat, so besteht sie bei 5-proc. Chromsäure aus einer grob-vacuoligen, hin und her wogender Masse, in der reges Leben herrscht. Hier fliessen einige sich berührende Vacuolen in eine grössere zusammen, dort taucht eine neue Vacuole als winziges Pünktchen auf, dabei verändert sich auch unausgesetzt die Breite der zwischen den schwankenden Vacuolen sich hinziehenden und sie umschliessenden Masse, die vollkommen homogen aussieht. Setzt man Wasser zu, so wird diese homogene, flüssige Chromgelatine äusserst fein lösungswabig, prachtvoll schaumig, sie löst sich aber nicht mehr in Wasser, sondern bildet dünne, allmählich homogen werdende, blasse Massen. Sicher ist also, dass starke Chromsäure schliesslich die Gelatine in eine nicht mehr erstarrende, aber in Wasser nur anfangs lösliche, später nur stark quellende Masse verwandelt, gewissermaassen in flüssigen Leim. Nur gewissermaassen, weil die Chromsäure sicher viel complicirter wirkt, als Essigsäure, mit der man ja auch flüssigen Leim machen kann. Schwächere Chromsäure (0,5-, 1-proc.) fällt dauerhaftere Globuliten, die, mehr oder weniger gequollen, sich nach einigen Stunden zu Boden setzen und hier vielfach mit einander zu gerüstigen oder klumpigen Massen, deren Aufbau aus isolirten Globuliten stellenweise ganz verwischt ist, vereinigen. Diese Gebilde sind sicher erstarrt in dem Sinne, wie Gelatine erstarrt, sie sind aber keine festen Körper, etwa vergleichbar den Granulis aus Albumosechromat.

Pikrinsäure (0,5) und Gerbsäure (2), nur in je einer Concentration gegenüber 15-proc. Gelatine geprüft, fällen ebenfalls Vollglobuliten, die sich schwer zu Boden setzen und tagelang die nicht mehr erstarrende Gelatine milchig trüben. Das Tannat ist sogleich schwer löslich in Wasser, es bilden sich nur Hohlglobuliten, die nicht bis zur Unkenntlichkeit aufquellen. Das Pikrat der Gelatine dagegen bleibt tagelang leicht löslich in Wasser, die Globuliten werden zunächst schön lösungswabig und verschwinden langsam ganz.

Alkohol weicht nur insofern ab, als er sich nicht so schnell und glatt, wie die wässerigen Lösungen der vorigen, mit der verflüssigten Gelatine mischt und daher ungleichmässiger gestaltete Niederschläge, fetzige, fädige, dehnbare Gebilde, daneben mehr häutige, faltige Massen und endlich auch schöne Vollglobuliten erzeugt. Die Grundform auch der alkoholischen Fällung ist der Vollglobulit, aus ihnen setzen sich zunächst auch die oben geschilderten Niederschlagsformen zusammen, die alle, frisch gebildet, in kaltem Wasser löslich sind, ebenso im Ueberschuss von Gelatine. Sehr bald verliert sich das, und es bleibt nur eine starke Quellbarkeit übrig, ungefähr dieselbe, die schon die käufliche Gelatine hat. In Alkohol betrachtet, sehen viele Theile des fädigen und häutigen Niederschlages ganz homogen aus, das meiste aber ist sehr enggerinnselig; oft schwer erkennbar, ob wirklicher Schaum oder nur dicht zusammengelagerte Globuliten. An den Fäden ist auch die von Bütschli (IV, p. 191) besprochene Kreuzstreifung zu sehen, die

ich aber als nebensächlich und für meine Beweisführung entbehrlich übergehe.

In Wasser wird man mancherlei an der frischen alkoholischen Fällung zu beobachten haben. Homogene Partien werden erst sehr eng, dann gröber wabig und lösen sich; von Anfang an sehr engwabige oder gerinnselige Häute oder Fäden quellen auf, die wabige Zeichnung verschwindet, um bei Alkoholzusatz wieder zu erscheinen. Endlich wird man im Wasser plötzlich grosse Schwärme von Globuliten auftauchen sehen, von denen man zunächst nicht recht weiss, woher sie kommen. Es unterliegt keinem Zweifel, dass viele homogene oder sehr eng-gerinnselige Abschnitte des Niederschlages aus dicht gedrängten Globuliten, die zuerst der Alkohol ausfällte, bestehen, und dass diese Globuliten nur durch das Wasser auseinandergeschwemmt werden.

II. Erstarrte Gelatine hat in der That ihre Fällbarkeit nicht verloren und äussert auch darin noch die Eigenschaften einer Flüssigkeit, dass sie genau in der Form und Beschaffenheit gefällt wird wie die verflüssigte. Dass die Gallerte überhaupt gefällt wird, ist ja sofort zu sehen, wesshalb ich nicht begreife, dass Bütschli, der doch (IV, p. 148) selbst bemerkte, wie die Gelatine in Chromsäure rasch trüb und gelblichweiss wurde, auf so grosse Irrwege gerathen konnte. Hätte Bütschli sich überlegt, warum seine Versuche nicht mit Kaliumbichromat und Pikrinschwefelsäure gelangen, so würde er bald eingesehen haben, dass nur solche Stoffe (Chromsäure, Gerbsäure, Alkohol, Aether), die physikalische oder chemische Fällungsmittel für nicht besonders angesäuerte Gelatine sind, die gewünschte „Art Gerinnung“ nebst Wabenbild hervorrufen. Bütschli hätte dann aber auch sofort erkennen müssen, dass die „Wabenstructur“ ein secundäres Gebilde ist, hervorgegangen aus der primären Globulitenfällung der erstarrten Gelatine, die zunächst gar keine Wabenstructur, auch nicht eine unsichtbare besitzt. Die Gerbsäure lieferte nur zum Theil gute Ergebnisse, und desshalb bevorzugte Bütschli (IV, p. 148) die Chromsäurelösungen, „die im Ganzen sicherer arbeiteten“. Richtiger hiesse es freilich, weil sie unsicherer „arbeiteten“, d. h. labilere, zur Schaumbildung stark neigende Fällungen gaben. Denn die Globuliten aus gerbsaurem Leim sind von Anfang an schwer löslich und weniger dazu befähigt, secundäre Lösungswaben zu bilden.

Bevor die globulitische Fällung geschildert werden kann, ist es noch nothwendig, auf Folgendes hinzuweisen. Die erstarrte Gelatine und das Fällungsmittel mischen sich nicht, wie zwei Flüssigkeiten, und infolgedessen wirkt z. B. die Chromsäure zunächst nur an der Oberfläche der Gelatine, aber hier gleich mit voller Concentration. Wenn also eine 0,5-proc. Chromsäure hier Globuliten fällt, so haben diese eine bestimmte, dem Chromgehalt entsprechende Gerinnungsfähigkeit, die unter der der ursprünglichen Gallerte liegt, aber doch noch hoch über der einer mit 5- oder 2,5-proc. Chromsäure gefällten Gelatine, die flüssig bleibt. Die eben entstandenen, noch gerinnungsfähigen Globuliten an der Oberfläche der erstarrten Gelatine werden nun aber unmittelbar von der in diese eindiffundirenden Chromsäure getroffen und haben daher Gelegenheit, sich mit Chrom anzureichern. Daher müssen sie schon in ganz kurzer Zeit, 1—2 Minuten, chrom-

reicher sein, als die benutzte Chromsäurelösung, und schliesslich in die nicht mehr erstarrenden, flüssigen Chromate übergehen. Im Innern der Gelatine beginnt dagegen die Fällung erst, wenn die herbeidiffundirende Chromsäure das Fällungsminimum, das zwischen 0.1 und 0.25 liegt, überschritten hat, und es dauert sehr lange, bis die Concentration wirklich bis auf 0,5 Proc. steigt. Man hat also an der Berührungsfläche der Gelatine mit der Chromsäure (Pikrinsäure) andere Fällungsbilder zu erwarten, als im Innern, hier sehr langsame, dort unmittelbare Wirkung, im Innern dauerhafte, primäre Globuliten, an der Peripherie secundäre Waben.

Versuche mit 40-proc. Gelatine, im Reagenzrohr in hohen Schichten erstarrt, auf die das Fällungsmittel aufgegossen wurde, veranschaulichten sehr schön das Wachsthum des Niederschlages an der Oberfläche und das lange Klarbleiben der Diffusionszone. Ich bespreche diese Versuche nicht näher, weil sie der mikroskopischen Verfolgung, die allein die primäre Globulitenfällung feststellen kann, nicht zugänglich sind.

In Hollundermark injicirte Gelatine gestattet am besten, die globulitische Fällung der erstarrten Masse zu verfolgen. Dünnere, 10—15-proc. Gelatine injicirt man einfach dadurch, dass man darin trockene Markprismen, nicht zu dick und nicht zu hoch, 1 Stunde lang im Dampfsterilisator kocht, während es für 40-proc. Gelatine nothwendig ist, vorher die Markstücke schon vollständig mit Wasser zu durchtränken.

Der Vortheil der Markversuche liegt ausser der unmittelbaren Beobachtung noch darin, dass die in einer Zelle eingeschlossene, erstarrte Gelatinemasse durch etwa in der Umgebung gelöste Gelatine nicht gestört wird, weil die Gelatine, wie alle Colloide, äusserst langsam nur diffundirt, viel zu langsam, um die schnell sich abspielenden Fällungserscheinungen zu stören und zu fälschen. Alles, was sich in einer Markzelle ereignet, geschieht nur an der darin eingeschlossenen Masse. Bütschli (IV, p. 150), den globulitische Ausfällungen bei seinen Chromversuchen in einige Verlegenheit bringen, so dass er sogar vor einer theilweisen Lösung der Gelatine durch Chromsäure nicht zurückschreckt, nimmt an, dass immer etwas Gelatine im Wasser der erstarrten Masse gelöst sei. Das könnten doch nur Spuren sein, die nicht die ganze Markzelle mit tanzenden Globuliten dicht erfüllen könnten. Diese müssen vielmehr durch globulitische Fällung aus der erstarrten Gelatine entstehen.

Da 40-proc. Gelatine keine wesentlich anderen Resultate gab, als 15-proc., so soll nur die letztere fernerhin berücksichtigt werden. Die Versuchsanstellung ist folgende. Dünne, ganze Zellen enthaltende Schnitte des injicirten, schon seit 20 Stunden erstarrten Markes werden trocken auf den Objectträger gelegt und mit einem auf Fettfüsschen ruhenden Deckglas bedeckt. Nachdem eine intacte Zelle mit homogener Gelatinefällung eingestellt ist, wird am Rande die fällende Flüssigkeit zugesetzt. Entweder man füllt nur den Raum unter dem Deckglas mit Chromsäure und überlässt dieser begrenzten Menge es nun selbst, durch Diffusion in die von Hollundermark umschlossene, erstarrte Gelatine vorzudringen; oder man saugt einen Strom von Chromsäure einige Zeit durch, um das Eindringen zu beschleunigen. Den folgenden Beschreibungen liegen Versuche nach der ersten Art, mit begrenzter Menge Chromsäure, zu Grunde.

Am geeignetsten, um die Globulitenfällung erstarrter Gelatine zu beobachten, ist 1-proc. Chromsäure. Sobald sie den Rand des Markschnittes erreicht, beginnt die Wirkung, die sich nun Schritt für Schritt an der in den Schnitt eindringenden Chromsäure in jeder Zelle von neuem (Fig. 21 *a*) wieder verfolgen lässt. Die ganz homogene, erstarrte Gelatine zerfällt in winzige, lebhaft molecular tanzende Globuliten (Körnchen, Kügelchen), die annähernd gleich gross und zuerst sehr klein sind, sicher nicht mehr als $^1/_2$ μ Durchmesser haben. Kaum entstanden, fangen diese winzigen Globuliten an zu quellen, und schon 1 Minute später sind sie zum 4—10-fachen Durchmesser aufgequollen (Fig. 21 *b* u. *c*). Alles schaukelt und wackelt noch molecular durch einander und bleibt nun stunden- und tagelang auf diesem Stadium. Etwa 6 Minuten nach Beginn des Versuches sind alle Zellen des Hollundermarkes mit gequollenen Globuliten erfüllt, nur am Rande des Schnittes überrascht ein anderes Bild. Statt der Globuliten liegen hier schaumig-vacuolige Massen, theilweise sehr engwabig mit schmalen Wabenwänden, theilweise grob- und ungleichmässig löcherig, mit breiten,

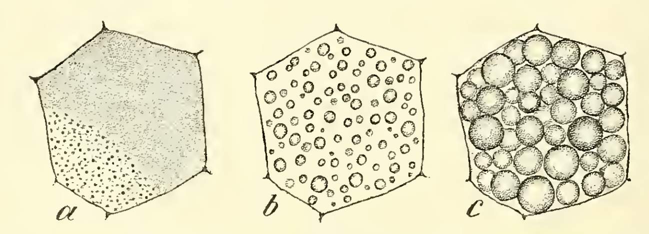


Fig. 21. Erstarrte Gelatine (15-proc.), in eine Hollundermarkzelle eingeschlossen, mit 1-proc. Chromsäure gefällt. In Fig. *a* ist der Beginn dargestellt, die Säure dringt von links vor und verwandelt die homogen erstarrte Gelatine in winzige tanzende Globuliten, die sehr bald die ganze Zelle erfüllen und sich schnell vergrössern (Fig. *b*), und in kurzer Zeit zu riesigen Kugeln aufquellen (Fig. *c*). Man vergl. den beistehenden Text. (Vergr. 600.)

homogenen Partien zwischen den Löchern, ähnlich wie löcheriger Käse. Die Ursache dieser schnellen Veränderung der auch hier zunächst entstehenden Globuliten ist schon p. 322 besprochen worden. Die Umwandlung der Globuliten verläuft so schnell, dass man kaum Zeit findet, sie noch zu sehen und in ihrer Metamorphose zu verfolgen. Einige Male gelingt das aber doch ganz gut. Schon an der stärkeren Gelbfärbung der löcherigen Massen ist ihr grösserer Chromgehalt zu erkennen, denn die im Innern ausgefällten Globuliten sind fast farblos. Sie bleiben auch so, während sie aufquellen, denn die neu herankommenden Chromsäuremengen sind zu verdünnt und können die zuerst entstandene, sehr chromarme Verbindung nicht in die chromreiche, nicht mehr erstarrende Verbindung umwandeln. Denn wenn eine solche schwache Chromverbindung bereits einige Zeit (10—20 Minuten) besteht, dann wird sie selbst durch 5-proc. Chromsäure nur sehr langsam in die flüssige, chromreiche verwandelt, sie ist schon beständig geworden und quillt nur noch in dem Maasse, als mit der nachgesaugten Chromsäure auch Wasser herbeiströmt. So gelang es z. B. nicht, mit 1-proc. Chromsäure in Hollundermark gefällte Globuliten durch reichliches Durchsaugen von 5-proc. Chromsäure in 1 Stunde in den wogenden Schaum zu verwandeln, den diese aus erstarrter

Gelatine erzeugt. Es bedarf hierzu einer viel längeren Wirkung der 5-proc. Chromsäure, wie folgender Versuch zeigt. Im Reagenzrohr aus 15-proc. verflüssigter Gelatine mit 0,5-proc. Chromsäure ausgefällte, 20 Stunden alte, erstarrte Globuliten wurden mit grossen Mengen 5-proc. Chromsäure übergossen. In der ersten halben Stunde veränderten sich die Globuliten nicht, selbst nach 20-stündiger Wirkung waren noch viele von ihnen voll und unverändert, sehr viele, wohl die meisten, waren in Hohlglobuliten verwandelt, und daneben fanden sich auch zahlreiche amöbenähnliche Massen mit vielen Lösungswaben. Die Wirkung der stärkeren Chromsäure war also unverkennbar, aber doch noch nicht so stark, wie wenn sie auf frische Gelatine hätte wirken können. Wenn aber, wie bei den Markversuchen, die Globuliten noch nicht erstarrt sind, so werden sie natürlich einer neuen Chromwirkung noch gut zugänglich sein.

Man sieht hieraus, wie complicirt und mannigfaltig die Erscheinungen sind, auf die weiter einzugehen ich mir versagen muss, weil ich nur die Grundlagen von Bütschli's Versuchen zu prüfen habe.

Saugt man nach der Fällung mit 1-proc. Chromsäure Wasser durch, so verblassen die Globuliten und werden zuerst sehr englöcherig; es entstehen Lösungswaben, bis endlich ein prachtvolles, enges Wabenwerk, das mit Bütschli's Elementarwaben wetteifern könnte, die schattenhaften Umrisse der stark geblähten Globuliten erfüllt. Durch sehr lang anhaltendes Durchströmen mit Wasser verschwinden die Fällungen endlich ganz, aber die kaum diffundirende Gelatinelösung bleibt natürlich in die Markzellen eingeschlossen. Setzt man jetzt wieder Chromsäure zu, so fällt diese die prachtvollsten Globuliten wieder aus, an denen nun durch Wasserzusatz dasselbe Spiel sich wiederholen lässt, wie an den aus der erstarrten Gelatine erzeugten. Zugleich wird man bei diesen secundären Fällungen auch tadellose Strahlungen um die Kernreste der Markzellen sich ausbilden sehen (vergl. hierzu das Kapitel über das Strahlungsphänomen). Da auch die an den Strahlen aufgereihten Globuliten wieder quellen, so verlieren jene bald ihre Zierlichkeit und werden plump durch die aufgeschwollenen Riesenglobuliten.

Ebenso, nur wenig langsamer, wirkt auf erstarrte Gelatine die 0,5-proc. Chromsäure, noch langsamer, aber immer noch gut, 0,25-, gar nicht mehr 0,1-proc., während 2,5-proc. fast schon so stürmisch eingreift wie 5-proc. Fast blitzartig verwandelt diese durch den ganzen Schnitt hindurch die erstarrte Gelatine in eine grobschaumige, wogende Masse, genau der Fällung im Reagenzrohr entsprechend. In einigen Zellen wird man die primäre Globulitenfällung noch beobachten können, bevor sie in den grob-vacuoligen Zustand übergeht. Soviel lässt sich also trotz aller Schnelligkeit der Reaction feststellen, dass zuerst allgemein auch 5-proc. Chromsäure Globuliten fällt. In kaltem Wasser lösen sich diese Globuliten und die homogen Partien der schaumigen Zustände unter Bildung prachtvoller Lösungswaben allmählich ganz auf. Durch neue 5-proc. Chromsäure fällt nunmehr in den anscheinend leeren Markzellen, wieder unter prachtvoller Strahlenbildung, die gelöste Gelatine in wimmelnden Globuliten wieder aus.

Kaliumbichromat (2,5-proc.) fällt, wie schon erwähnt, die Gelatine nur, wenn noch besonders angesäuert wird. Das gibt gute Gelegenheit, um die Globulitenfällung erstarrter Gelatine im Hollundermark mit gewisser Eleganz zu zeigen. Man legt die Markschnitte

sogleich in das Kaliumbichromat, wo selbst nach 20—30 Minuten die erstarrte Masse vollkommen klar und homogen geblieben ist. Setzt man nunmehr am Rande einen Tropfen starker Essigsäure zu, so erscheinen in den einzelnen Markzellen die winzigen, molecular zitternden Globuliten, sobald die Säure herankommt und in dem Maasse, in dem sie weiterschreitet, füllen sich auch die Zellen mit typischen, langsam quellenden Globuliten von derselben Grösse wie in der Chromsäure.

Gerbsäure (2-proc.) verwandelt ebenfalls die erstarrte Gelatine in dichte Schwärme zitternder Globuliten, die von Anfang an langsamer quellen als die vorigen, ihnen aber im Durchmesser gleichen.

Auch Pikrinsäure (0,5-proc.) fällt die erstarrte Gelatine zunächst rein in Vollglobuliten aus, die auch hier quellen und am Rande schaumige Massen secundär erzeugen. Es hätten natürlich auch noch dünnere Pikrinsäurelösungen geprüft werden müssen, das unterblieb, weil Bütschli gar nicht mit Pikrinsäure gearbeitet hat. Sie wurde nur gewählt, um die Gleichartigkeit der Fällung noch an einem anderen Stoffe vorzuführen.

Alkohol (96-proc.) soll nach Bütschli (IV, p. 172) dieselbe Elementarstructur der erstarrten Gelatine enthüllen wie die Chromsäure, was auch in einer ähnlichen Wabengrösse (0,7 μ) sich ausspreche. Das ist begreiflich, weil der Alkohol zunächst auch Globuliten ausfällt, die mit denen aus Chromsäure gleiche Grösse haben; es müssen dann auch die p. 315 besprochenen Zwickel oder auch secundäre Lösungswaben annähernd gleich gross werden. Alles das beweist für die Elementarwaben gar nichts. Da der Alkohol in die erstarrte Gelatine begreiflicherweise nicht so glatt diffundirt wie die wässrige Chromsäure, so gibt er ähnliche unregelmässigere Niederschläge wie in der flüssigen Gelatine. Neben Markzellen, die mit schönen Globuliten erfüllt sind, liegen solche mit protoplasmaähnlichen, fädigen und strangartigen oder anders gestalteten Niederschlägen, die sehr eng-gerinnselig structurirt sind und wohl fast alle aus dicht zusammengedrängten Globuliten bestehen, deren Zwickelräumchen in der schon p. 315 besprochenen Weise wirken. Daneben liegen auch unzweifelhaft wabige Structuren, in denen wir wieder secundäre Lösungsbilder vor uns haben, denn die frisch gefällten Globuliten sind schon in verdünntem Alkohol löslich. Da nun durch die Fällung der Gelatine Wasser stets in der Umgebung eines eben ausgefällten Globuliten frei wird, so verdünnt sich der Alkohol, und es treibt das Globulit der Lösung entgegen, die aber in ihrem Fortschritt durch neu herantretenden Alkohol unterbrochen wird. So schwanken gerade diese alkoholischen Niederschläge von Fällung zu Lösung, von Lösung zu Fällung und gehen desshalb sehr leicht in die secundäre Schaumstructur über. Die primäre Fällung ist aber auch hier die in Vollglobuliten.

Unbestreitbar ist also festgestellt, dass die Mittel (Chromsäure, Alkohol), welche nach Bütschli durch eine einfache Wasserentziehung die elementare Wabenstructur nur verdeutlichen sollen, die erstarrte Gelatine in Vollglobuliten ausfällen, dass alle zu beobachtenden Wabenbilder secundäre Producte sind.

Das haben wir noch mit Bütschli's eigener Methode zu bestätigen.

Bütschli's Versuche mit dünnen Schichten erstarrter Gelatine

bieten gewissermaassen nur die Oberflächenwirkung dar, die wir am Hollundermark kennen lernten, während die tieferen Schichten ganz fehlen. Das erste Stadium, das globulitische, wird also hier allgemein schnell vorübergehen und nur an dicken Stellen der Gelatine in den tieferen Schichten sich erhalten können. Der schaumige, wabige, stets secundär erst sich hervorbildende Zustand wird bei BÜTSCHLI's Versuchsanstellung also sicher dominiren, so schnell und allgemein eintreten, dass er als der ursprüngliche erscheinen könnte. BÜTSCHLI hat den primären Zustand entweder gar nicht gesehen oder als wabig gedeutet. Leider ist nicht zu erkennen, ob BÜTSCHLI unmittelbar den Vorgang der Gerinnung ab ovo unter dem Mikroskop verfolgte oder nur das Endresultat sich besah und die mit Gelatine bestrichenen Deckgläser in den Fällungsflüssigkeiten $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde ohne Controle liegen liess. Da BÜTSCHLI sich jedenfalls bemühte, immer möglichst dünne Gelatineschichten zu haben, so könnte man hierin die Ursache dafür suchen, dass er die freie Globulitenfällung nicht beobachtete, weil die Gelatine am Deckglas haftete und so gefällt wurde. Ich bin überzeugt, dass der Grund ein anderer ist, nachdem ich unmittelbar unter dem Mikroskop BÜTSCHLI's Versuche verfolgt habe. Die zusammenhängende Schicht Gelatine, die hier auf einmal gefällt wird, ist zu gross, es fehlen jene kleinen, allseits abgeschlossenen Räume, die im Hollundermark den Vorgang so schön zu sehen gestatten. Sobald über die auf Deckgläsern oder Objectträgern ausgebreitete Gelatineschicht das Fällungsmittel sich ergiesst, wird eine dicht zusammenhängende Decke sehr schnell quellender Globuliten gefällt, die überall seitwärts, auch oben und unten aneinander hängen bleiben und so sich gegenseitig festhalten. Anders im Hollundermark, wo in jeder Zelle ein abgegrenztes Ganzes von Gelatinegallerte liegt. Sobald die hereindringende Chromsäure die ersten Globuliten an der Zellwand fällt, können diese sich noch vor der Quellung von einander trennen, und damit ist weiterer Zerfall angebahnt.

Ich habe mit einer Platinöse einen kleinen Tropfen 15-proc. Gelatine auf dem Objectträger flach ausgebreitet, erstarren lassen und auf Fettfüsschen ein Deckglas aufgelegt. Nachdem mit dem Mikroskop eingestellt war, wurde am Rande das Fällungsmittel zugesetzt, das sich allmählich über die Gelatine ergoss. Dabei liess sich feststellen, dass sowohl 0,5-proc. Chromsäure, als auch 0,5-proc. Pikrinsäure oder Alkohol zuerst Globuliten ausfällen, die aber dicht zusammengelagert bleiben, nicht sich trennen und molecular zittern. Die gefällte Gelatine sieht jetzt genau so aus, wie auf dem Deckglas angetrocknete Globuliten aus Gelatinepikrat (vergl. p. 315); dieser Zustand geht aber meist sehr schnell vorüber und ist sicher in der Zeit ($^1/_4$—$^1/_2$ Stunde), die BÜTSCHLI zum Gelingen der Versuche beansprucht, längst dem secundär wabigen gewichen. Schon 1—2 Minuten nach der primären Globulitenfällung verwandelt sich die Gelatine in einen secundären Lösungsschaum, der nun wieder, da die einzelnen sich hohlkuglig lösenden Globuliten sehr dicht gelagert sind und sich gegenseitig an zu starker Aufblähung hemmen, die engwabigen Bilder gibt, die BÜTSCHLI als primäre, nur verdeutlichte Elementarstructur der erstarrten Gelatine auffasst. Besonders schön und gleichmässig bleiben diese secundären Zustände bei 0,5-proc. Chromsäure und bei Alkohol, während die stärker wirkende Pikrinsäure sehr bald grob-vacuolig, käsig aussehende Lösungsstadien hervorruft. Die 5-proc. Chromsäure ver-

wandelt das auch hier zuerst sich bildende Globulitenhaufwerk so schnell in die flüssige, grob-vacuolige, wogende Masse, die schon p. 321 beschrieben wurde, dass dieser Zustand überhaupt als der Anfang erscheint, sobald man sich nicht dazu hält.

Worauf beruht der schnelle Uebergang der globulitischen primären Fällung in den wabigen, secundären Lösungsschaum? Für Bütschli's Hauptreagens, die Chromsäure, ist die Antwort schon gegeben. Es wirkt sofort die volle Concentration, und die neu entstandene, noch weiterer Umbildung fähige Verbindung nimmt noch mehr Chromsäure auf, bis sie in den labilen, chromreichen Zustand übergeht und sich in der dünnen Chromsäure, die sie umgibt, zu lösen beginnt. Die ersten Waben sind natürlich sehr eng und klein, weil die Löslichkeit doch zunächst eine geringe ist. Da nun andererseits die weitere Chromzufuhr aufhört, weil die Zeit des Versuches abgelaufen ist, so erhalten sich die engen Waben. Sie bleiben aber auch, wenn man die Chromsäure länger wirken lässt, bestehen, weil die Wabenmasse inzwischen erstarrt oder halberstarrt ist. Behandelt man den primären globulitischen Zustand der Chromfällung mit Wasser, so wird er natürlich auch engwabig. Diese Wasserwirkung spielt aber bei Bütschli's Versuchen keine Rolle, denn hier wird die Gelatine schon in der Chromsäure secundär feinwabig. Wenn auch meine Erklärung für diese secundäre Wabenbildung noch einer weiteren Ausarbeitung bedarf, so wird doch Niemand, besonders wenn er die Hollundermarkversuche nachmacht, daran mehr zweifeln können, dass primär Globuliten gefällt werden.

Einfacher dürfte sich die secundäre Schaumstructur erklären, die Alkohol bei Bütschli's Versuchsanstellung gibt. Wie schon p. 326 hervorgehoben wurde, wird, sobald der Alkohol die Globuliten ausgefällt hat, Wasser verfügbar, dass nun in einem Minimum von Zeit in die Globuliten eindringt und sie lösungswabig macht. Wenn dann im nächsten Zeittheilchen der Alkohol sich wieder concentrirt, so kann er zwar die weitere Lösung aufhalten, die einmal entstandenen, sehr engen Waben aber müssen, da die Gelatine ihrer Wände ja nun immer starrer wird, bleiben.

Um ein allgemeines Wort zu haben, kann man sagen, dass *die grosse Labilität der frisch gefällten Gelatineglobuliten*, ihre Löslichkeit im verdünnten Fällungsmittel, die secundäre Schaumbildung herbeiführen und beschleunigen muss, auch wenn solche Complicationen wie bei der Chromsäure, nicht eingreifen.

Die primäre, rasch sich verändernde Globulitenfällung der auf Objectträger aufgestrichenen Gelatine muss natürlich Zwickelwaben-Bilder geben, denn selbst die dünnste Schicht einer 10—25-proc. Gelatine, die man herstellen kann, ist doch noch so substanzreich, dass sie in übereinander gelagerten Globuliten gefällt werden muss. Bütschli's Gelatinebilder sind durchweg wirklich secundär-lösungswabig, nur Fig. 9, Taf. XXI, scheint mir ein solches globulitisches Anfangsstadium zu sein. Da Bütschli aber zweifellose Zwickelwaben, wie die von Hühnereiweiss (Taf. XVIII, Fig. 1, 2) kurzweg als wabig bezeichnet, so ist aus seiner Schilderung der Gelatineversuche gar nicht zu erkennen, ob er das primäre Stadium, die globulitische Fällung erstarrter Gelatine, überhaupt gar nicht gesehen oder nur als wabig unter die echten Wabenbilder einrangirt hat.

2. Strahlungen.

Strahlungen um Luftblasen entwickeln sich nach Bütschli (IV, p. 155) nur gut und einigermaassen zuverlässig in 30—40-proc. Gelatine, jedoch haben alle solche Versuche „noch etwas Unberechenbares“ und schlagen zuweilen ganz fehl. Sämmtliche von Bütschli abgebildete Strahlungen, auch die Doppelstrahlungen um benachbarte Luftblasen sind mit 0,3-proc. Chromsäure hergestellt (Taf. I, Fig. 7—9 Taf. II, Fig. 1, 3 u. 6, Taf. XVII, Fig. 4, Taf. XXI, Fig. 2, 5, 6).

Um die Luftblase bildet die Gelatine häufig, nicht immer, einen „homogen erscheinenden Hof, an dessen Peripherie erst die Strahlung beginnt“ (Bütschli, IV, p. 156; z. B. Taf. XVII, Fig. 4). Dieser dichtere Hof homogener Gelatine soll nach Bütschli (IV, p. 156) dadurch entstehen, dass die sich verkleinernde Luftblase einen Zug auf die umgebende Gelatine ausübt und so deren Waben derartig verengert werden, dass sie auch durch die Chromsäure nicht sichtbar zu machen sind. Auch soll möglicherweise etwas Flüssigkeit in die Umgebung ausgepresst werden, was auch noch zur Verengerung, Verfeinerung und schliesslichen Unsichtbarkeit der Waben beitragen soll. Der von der sich abkühlenden und dabei sich zusammenziehenden Luftblase ausgeübte Zug soll nach Bütschli (IV, p. 165) zwar eine schwache Strahlung hervorrufen können, den Hauptantheil soll aber eine, „wenn auch mässige, Absorption der Blasenluft“ haben, die aber so gering ist, dass selbst Bütschli (IV, p. 166) „fast nie stärkere Deformationen“ solcher Luftblasen, um die eine schöne Strahlung sich gebildet hatte, beobachten konnte. Dass die Strahlung selbst nur eine Umordnung und Erweiterung des bereits vorher bestehenden elementaren Wabenwerkes sein soll, mag nochmals erwähnt werden.

Der ganze Erklärungsversuch Bütschli's vom homogenen Hof bis zur fertigen Strahlung ist meiner Ansicht nach vollkommen missglückt; aus zwei Gründen. Erstens hindert die Voraussetzung eines elementaren Wabenbaues der erstarrten Gelatine jede freiere Beurtheilung der Thatsachen, zweitens hat Bütschli ganz übersehen, dass Luft und Gelatine ein sicherlich recht ungleiches Wärmeleitungsvermögen haben, dass die Luft, obgleich auch ein schlechter Wärmeleiter, sich doch schneller abkühlen muss als die Gelatine, auch wenn (Bütschli, IV, p. 155) nach dem Einrühren der Luftblasen noch über kochendem Wasser „rasch tüchtig erhitzt“ wird. Ich glaube sogar, dass dieses rasche und tüchtige Erhitzen recht gleichgiltig ist, denn die Hauptwirkung der Luft ist schon vorüber. Sie beruht darauf, dass die eingerührte Luft von Zimmertemperatur kälter ist als die verflüssigte Gelatine, und dadurch, sobald die Luftblasen sich consolidirt haben, kleine Centren für schnellere Erstarrung der Gelatine geschaffen sind. Sofort muss die Wirkung sich äussern, das tüchtige Erhitzen kann sie zwar aufhalten, aber doch aus der einmal eingeschlagenen Richtung nicht mehr ablenken. Die schneller erstarrende Schicht muss aber die angrenzende Gelatine radiär centriren und so in der That, wie Bütschli voraussetzt, schon vor der Chrombehandlung die kleinsten unsichtbaren Theilchen, gleichviel ob Waben oder Micelle, strahlig zur Luftblase orientiren. Die Chromsäure erhält nur bei der Fällung die schon vorhandene Anordnung, die secundär sich bildenden Waben erscheinen radiär gestreckt, weil sie unter dem vom homogenen Erstarrungsring ausgehenden Zuge stehen. Diese

zuerst erstarrte Zone bleibt in der Chromsäure wohl desshalb homogen, weil sie aus viel dichter zusammengelagerten Gelatinetheilchen besteht, also auch wasserärmer (daher glänzender ist) als die sich anschliessenden, strahlig-wabig werdenden Partien. Die von der Chromsäure in der dichten Zone ausgefällten Globuliten sind also wahrscheinlich lückenlos zusammengepresst.

Die mehr oder weniger schönen Strahlungen, die Bütschli (IV, p. 166, 167) um eingestreuten gebrannten Alabaster, um getrocknetes und geronnenes Hühnereiweiss, um Leberthrantröpfchen hervorrufen konnte, verlangen keine andere Deutung als die vorigen, denn alle die genannten Beimengungen haben auch Zimmertemperatur, sind kälter als die Gelatine. Stärke der Strahlung, Fehlen oder Vorhandensein des homogenen Hofes werden von dem Wärmeleitungsvermögen der Objecte wesentlich abhängig sein.

Ich will nicht verabsäumen, die Aehnlichkeit der Gelatinestrahlungen mit protoplasmatischen Strahlungen anzuerkennen und hinzufügen, dass sie nach der früher (p. 224) aufgestellten Unterscheidung als eine besondere Art der Selbststrahlung aufzufassen sind. Desshalb, weil die als Centren wirkenden Luftblasen etc. activ die umgebende Gelatine radialstrahlig orientiren, nicht bloss, wie die Kernreste im Hollundermark, als Fremdkörper wirken. Im Uebrigen verweise ich auf den ausführlichen Abschnitt über das Strahlungsphänomen.

3. Die Wabenstructur der erstarrten Gelatine.

Nach Bütschli ist die Wabenstructur der erstarrten Gelatine nur ein durch Chromsäure, Alkohol etc. leicht zu verdeutlichendes Beispiel eines allen quellbaren Substanzen gemeinsamen, elementaren Baues. In der erstarrten Gelatine, die nach Bütschli (IV, p. 188) ein fester Körper ist, liegt ein „festes Gerüstwerk“ (IV, p. 158, 170, 187), richtiger Wabenwerk, dessen Wabenwände aus wasserhaltiger Gelatine bestehen, aus einem problematischen Gelatinehydrat, „das biegsam und dehnbar ist“. In den Wabenräumchen aber ist Wasser, das Spuren von Gelatine gelöst enthält. Obgleich es nicht gelingt, an der erstarrten, nicht gefällten Gelatine etwas von diesem feineren Bau zu entdecken, so findet doch Bütschli (IV, p. 188) einen Trost: „Die Unmöglichkeit, eine Structur in der unveränderten wasserhaltigen Gallerte wahrzunehmen, spricht jedoch in keiner Weise gegen die Möglichkeit, ja Wahrscheinlichkeit, dass die feine Wabenstructur schon vorhanden ist.“ Sie wird nach Bütschli (IV, p. 148, 150) durch Chromsäure, Alkohol sichtbar, weil diese den Wabenwänden Wasser entziehen und dadurch ihr Lichtbrechungsvermögen über das des Wabeninhaltes steigern. Wenn wirklich die Chromsäure nur durch Wasserentziehung (IV, p. 150) die Elementarwaben sichtbar machte, dann müsste doch 5-proc. noch besser wirken als 0,5-proc. Statt dessen (IV, p. 149) soll die stärkere Lösung das feine Schaumgerüst bald zerstören, „jedenfalls“ „durch Verflüssigung“ des Wabenwerkes. Ein solcher Wechselbalg an Wirkung, der bald Wasser entzieht, bald verflüssigt, ist nun doch die Chromsäure nicht. Wenn in 0,3-proc. Chromsäure „engwabig“ geronnene Gelatine in 5-proc. Chromsäure nachträglich grobschaumig wird (IV, p. 149), so beruht das nach p. 325 darauf, dass chromreichere, nicht mehr erstarrende Verbindungen entstehen.

Die wahre Wirkungsweise der genannten Gerinnungsmittel, die die erstarrte Gelatine ebenso globulitisch fällen wie die verflüssigte, hat BÜTSCHLI ganz verkannt, ebenso die grosse Labilität dieser Niederschläge, die secundär erst schaumig werden. Die Beweisführung BÜTSCHLI's stürzt daher in sich zusammen.

Es bedarf zu ihrer Widerlegung kaum noch des Hinweises, dass homogen durch Pikrinsäure oder Chromsäure oder Alkohol frisch gefällte Gelatine schon durch Wasser wabig wird, dieselben Elementarwaben zeigt, die gerade durch Wasserentziehung in den Bereich des Sichtbaren gerückt werden sollen. Warum solche homogene Globuliten oder grössere Massen, die sich doch schliesslich in Wasser lösen, nicht einfach zusammenschmelzen, sondern erst fein-, dann gröber schaumig werden und dann erst ganz sich lösen, ist kein Räthsel. Auch die in Wasser bei gutem Schütteln leicht lösliche Pikringelatine diffundirt doch nur sehr langsam und quillt, bevor sie sich löst, im Wasser erst auf. Wenn also zu homogener, frisch gefällter Chromgelatine Wasser zufliesst, so verbreitet es sich, bevor die Lösung beginnt, durch die ganze Masse, die ja deutlich quillt, was sich auch in dem Schliessen kleiner, bereits vorhandener Hohlräumchen zu erkennen gibt. In der vom Wasser durchsetzten Gelatine beginnt nun an zahlreichen Punkten die Lösung gleichzeitig. Aber da die gelöste Gelatine an und für sich schwer diffundirt, durch die sie umgebende Gelatine sicher gar nicht durchdringen kann, so sammelt sie sich in winzigen Räumchen an, die der ganzen Masse zuerst ein fein nadelstichiges Aussehen verleihen. An der inneren Oberfläche dieser winzigen Vacuolen löst nun die Gelatine sich weiter, die Räumchen dehnen sich langsam aus und schieben die noch ungelösten Reste zu den Wänden des so entstehenden Schaumwerkes zusammen. Von dem Löslichkeitsgrade der Gelatinefällung, der Schnelligkeit des Wasserzuflusses hängt in erster Linie der Verlauf dieser Schaumbildung ab, Grösse der Wabenräume, Zartheit der Wabenwände sind dadurch bedingt. Denselben Process lernten wir bereits an der Alkoholfällung der Albumose kennen, nur verläuft dort alles viel schneller, weil die Albumose viel leichter in Wasser sich löst, als die Gelatine. Sollen nun bei dieser nur die winzigen, um 1 μ Durchmesser schwankenden Waben wirkliche Elementarwaben sein, die anderen aber anderswerthige Producte nachträglicher Zerstörung der Grundstructur? Das wird wohl Niemand vertheidigen wollen.

Aber BÜTSCHLI's Theorie verträgt sich auch nicht mit der Eigenschaft erstarrter Gelatine, Salzlösungen in ihrer Diffusion nicht zu hemmen, die genau so schnell diffundiren wie in reinem Wasser (OSTERWALD, II, p. 687). Wenn hierbei Tausende und Abertausende von noch so zarten Wabenwänden zu passiren wären, so müsste die Diffusion auffällig verlangsamt sein. Ja BÜTSCHLI's Annahme (IV, p. 187), dass das Wasser der Wabenwände „chemisch gebunden“ sei an ein Gelatinehydrat, führt zu dem Schluss, dass in erstarrter Gelatine die Diffusion sehr verlangsamt sein müsste. Denn wie sollen die in Wasser gelösten Salzmolekeln die Wabenwände ungehemmt passiren, in denen kein freies Wasser sie aufnehmen kann? Aber selbst wenn man von diesem Einwand absieht, so bleibt noch die Albumosestrahlung in 5—10-proc. erstarrter Gelatine, die p. 293 geschildert wurde. Die feinen, schnurgerade vom Kernrest der Hollundermarkzellen zur Peripherie verlaufenden Strahlen (Fig. 13*a*, p. 222)

könnten sich sicher nicht entwickeln, wenn sie immer von neuem wieder auf Wabenwände stiessen und von ihnen abgelenkt würden. Das hat ja bereits am gröberen Wabenwerk der Versuch auf p. 292 gezeigt. Freie Beweglichkeit ist eine Hauptbedingung für die Strahlenbildung. Wenn sie mit Osmiumsäure in 20-proc. erstarrter Gelatine ausbleibt, so trägt diese allerdings die Schuld, aber desshalb nur, weil sie zuviel von dem Fixirungsmittel zur eigenen Fällung verbraucht. Das Gelatine nicht fällende Sublimat (1-proc.) erzeugt auch jetzt noch die schönsten Strahlungen. In Sublimat sowohl, wie bei Osmiumsäure entwickeln sich aber die Strahlungen immer langsamer, als in der gelatinefreien Albumose, nicht etwa desshalb, weil die Diffusionsgeschwindigkeit vermindert ist, sondern weil chemische Wechselbeziehungen etwas hemmen. Osmiumsäure mit Essigsäure versetzt, fällt ja Gelatine, und auch das nicht fällende Sublimat hat chemische Affinitäten, die zur vollen Auslösung nur eines Zusatzes von Salzsäure bedürfen. So werden gewissermaassen durch diese chemische Anziehung die diffundirenden Theilchen gefesselt und können erst nach einiger Zeit bis zum Kernrest gelangen und die zur Strahlung nöthige Concentration erreichen. Alles das nimmt dem Einwande, dass ein Wabenbau der erstarrten Gelatine überhaupt die Strahlung verhindern müsste, nichts von seinem Gewicht.

Der Leser mag mir noch gestatten, einige weitere Wahrscheinlichkeitsgründe, die Bütschli für seine Theorie verwerthen zu können glaubt, kurz zu widerlegen. Die Behauptung, dass erstarrte wässrige Gelatine ein fester Körper sei, „wie sich in ihrem ganzen Verhalten klar ausspricht“ (Bütschli, IV, p. 188), ist schon als Irrthum bezeichnet, auf die Zwitternatur der Gallerte bereits p. 319 hingewiesen worden. Bütschli (IV, p. 188) hält es für erwiesen, dass der Alkohol nur durch Wasserentziehung die feinen Schaumstructuren dem Auge zugänglich mache. Er sagt (IV, p. 188): „Da nun bei der Einwirkung des Alkoholes auf die Gelatinegallerte unmöglich eine vorübergehende Verflüssigung eintreten kann, welche erklärlich machte, dass das schaumige Gerinnungsproduct die genannten Eigenschaften flüssiger Schäume annimmt, so folgt hieraus, dass die Structur zu der Zeit entstanden sein muss, als die flüssige Gelatine zur festen Gallerte erstarrte; denn nur in diesem Zeitpunkt waren die Bedingungen zur Ausbildung der genannten Eigenthümlichkeit gegeben.“ Wir erwidern, der Alkohol entzieht nicht bloss Wasser, sondern fällt auch die erstarrte Gelatine globulitisch aus, aber in so labilem Zustande, dass Lösungswaben entstehen müssen. Die Wabenstructur ist ein secundäres Product, sowohl bei Alkohol- als bei Chromsäurewirkung. Wenn daher in beiden Fällen die Lösungswaben „nahezu identische Grösse“ haben (IV, p. 189), so folgt hieraus keineswegs, dass in beiden Fällen die verborgene Elementarstructur zu Tage getreten ist, denn man kann ja dieselben Waben auch durch Wasserzufuhr hervorrufen.

Auch die Strahlungsfiguren um Luftblasen führt Bütschli (IV, p. 189) ins Feld. Er übersieht, dass in der homogen erstarrten Gelatine vorhandene Spannungen sehr wohl die Ausgestaltung der secundären Lösungswaben beeinflussen und diese radiär strecken können. Denn der ganze Vorgang, vom Beginn der globulitischen Fällung bis zur secundären Schaumbildung, verläuft äusserst rasch, eine allgemeine Verflüssigung, die solche Spannungen aufheben könnte, tritt gar nicht

ein. Dasselbe gilt für die Kreuz- und Querstreifung gedehnter, gedrehter und gepresster Gelatinefäden.

Einer neuen Zugwirkung, wie Bütschli (IV, p. 189) meint, würde es gar nicht bedürfen, weil erst durch die Chromsäure oder den Alkohol die wabige Structur hervorgerufen wird. Denn diese wird sich einfach nach den in der Gelatine bereits bestehenden Spannungen entwickeln.

Ich hoffe, dass mein Urtheil nicht unbegründet erscheinen wird, wenn ich sage, dass Bütschli ohne ausreichende Vorstudien über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Gelatine an das schwere Problem herangetreten ist, die Micellartheorie zu entthronen. Diese geht unerschüttert aus der Campagne hervor, ja Bütschli selbst (IV, p. 226—228) liebäugelt stark mit den Micellen und möchte wohl gern für Micell Globulit setzen, um seine Theorie mit der Naegeli's zu versöhnen. Dahinter steckt der geheime Gedanke an die Hohlglobuliten, die aus einer Elementarwabe bestehen, und so würde sich alles aus solchen schönen Elementarwaben aufbauen. Nur bliebe noch die Frage: woraus besteht die Wand der Elementarwaben, die doch immerhin gut wahrnehmbar dick ist? Die Wand der Gelatinewaben (Bütschli, IV, p. 187) ist wasserhaltige Gelatine (Gelatinehydrat), also sicher nicht nochmals aus feineren Waben aufgebaut. Hier scheint mir doch die Micellartheorie zu Hilfe kommen zu müssen. Auf diese molecular-theoretischen Fragen verlohnt es nicht, weiter einzugehen, weil schon die gröberen Grundlagen von Bütschli's Arbeit unbrauchbar sind.

3. Eiweiss.

Von Eiweisskörpern in engerem Sinne hat Bütschli (IV, p. 61) nur geschlagenes und filtrirtes Hühnereiweiss, also ein hochprocentiges Gemenge von Albumin und Globulin untersucht. Da diese beiden Stoffe nach dem ersten Theil dieser Arbeit sich gleich verhalten, beide typische Gerinnselbildner sind, so ist auch gefälltes Hühnereiweiss ein einheitliches Gerinnsel aus winzigen, gerüstartig zusammengesetzten Globuliten. Darüber kann kein Zweifel sein, dass die äusserst engmaschigen, dichtem Protoplasma gleichenden Fällungen aus Albumin und Globulin wirklich aus ursprünglich isolirten, winzigen Vollglobuliten entstehen (man vergl. p. 281 dieser Arbeit). Bütschli (IV, p. 62, 68) behauptet, dass sowohl durch Hitze coagulirtes, als auch durch Chromessigsäure oder Pikrinschwefelsäure gefälltes Hühnereiweiss rein wabig gebaut sei. Da (B., IV, p. 61) die Gerinnungsschäume aus Pikrinschwefelsäure dem coagulirten Eiweiss „in jeder Beziehung“ entsprechen, so beschränke ich meine Kritik auf die Niederschläge, über die ich eine jahrelange Erfahrung besitze.

Bütschli (IV, p. 68, 69) fand, dass Hühnereiweiss von 1-proc. Osmiumsäure, von einfach chromsaurem Ammon gar nicht, von Kaliumbichromat und Müller'scher Lösung nur sehr unvollkommen gefällt, von 24-proc. Alkohol nur leicht getrübt wurde. Aus seinen Beobachtungen soll sich „jedenfalls“ ergeben, „dass eine Anzahl der vorzüglichsten Conservirungsmittel der histologischen Technik gar keine oder sehr mangelhafte Gerinnung bewirken“. Dass dieser Satz sich nicht einbürgert, dafür sorgt hoffentlich schon der erste Theil dieser Arbeit. Bütschli hat übersehen, dass das Hühnereiweiss al-

kalisch reagirt und dass desshalb eine ganze Gruppe von Fixirungsmitteln (vergl. p. 11), zu der besonders Osmiumsäure, Kaliumbichromat gehören, ganz versagen. Angesäuerte Lösungen von Albumin und Globulin werden auch von ihnen gefällt. Pikrinschwefelsäure aber und Chromessigsäure werden von der alkalischen Reaction nicht beeinflusst, während selbst concentrirte Sublimatlösung doch etwas empfindlich ist.

Die Pikrinfällungen von Albumin, Globulin und Casein sind augenblicklich löslich in 0,2-proc. Kali, man könnte also vermuthen, dass das Alkali des Hühnereiweisses die primären Fällungsglobuliten secundär löste und so in ähnliche Schaumbildungen umwandelte, wie wir bei der Gelatine kennen gelernt haben. In 0,2-proc. Kali gelöstes Albumin (Eier- und Serumalbumin), Globulin und Casein werden aber von reiner Pikrinsäure augenblicklich gefällt und setzen sich in Niederschlägen ab, die genau so gebaut sind, wie die aus sauren Lösungen. Erst recht müssen die von Bütschli benutzten, noch besonders angesäuerten Lösungen der Pikrin- und Chromsäure unbehindert von Alkali gewirkt haben. Niederschläge aus Hühnereiweiss, die ich mit solchen aus Albumin, Globulin etc. verglich, stimmten durchaus mit ihnen überein. Sie hatten die schon oft, zuletzt p. 281 geschilderte Structur, waren also nicht wabig. Aufgetrocknet, sehen sie genau so aus wie Bütschli's (IV, Taf. XVII, Fig, 1, 2, 7) Abbildungen von coagulirtem Hühnereiweiss, die nach ihm zwar wabig gebaut sein sollen, was ich aber bestreiten muss. Wenn man die Globuliten aus Pikringelatine auf einem Deckgläschen eintrocknen lässt und nun in Luft besieht, so geben die lufterfüllten Lücken, die zwischen den Globuliten, ähnlich wie bei über einander geschichteten Kugeln übrig geblieben sind, genau das von Bütschli immer und immer wieder als wabig bezeichnete Bild der Zwickelwaben. Hier ist doch jeder Zweifel an der Art des verborgenen Baues ausgeschlossen, es sind zusammengelagerte Kügelchen. Genau so entsteht aber auch die Pikrinfällung des Hühnereiweisses, und desshalb ist sie nicht wabig, sondern engmaschig-gerüstig gebaut. Selbst eine äusserst dünne Schicht Hühnereiweiss ist doch noch sehr substanzreich, denn, schlecht gerechnet, enthält es doch ungefähr 20 Proc. Eiweisskörper. Die durch Hitze oder Pikrinschwefelsäure ausgeschiedenen Globuliten werden also äusserst zahlreich sein und sich sehr dicht zusammenlegen, so dass die Weite der Waben (B., IV, p. 63), die wieder um 1 μ schwankt, nicht überraschen kann. Eine elementare Bedeutung haben aber diese Wabenräume, die gar keine sind, nicht.

Dass die beim Einspritzen von Eiweiss in Chromessigsäure entstehenden Fäden faserig-wabig (B., IV, Taf. XVII, Fig. 9) aussehen, ist nicht zu verwundern, weil hier die Globuliten vorwiegend in der Richtung sich an einander ansetzen, in der die Fällung fortschreitet, d. h. in der Bewegungsrichtung des sich herabsenkenden Eiweisstropfens.

Nach Bütschli (IV, p. 63) ist der Alveolarsaum, der häufig an den Rändern des in Paraffinöl geronnenen Eiweisses sich hinzieht, ein besonders wichtiger Beweis für die Schaumnatur des Coagulates. Dieselbe Alveolarschicht wird auch um einen mitten in das Eiweiss hineingerathenen Tropfen von Paraffinöl (IV, p. 64, Taf. XVII, Fig. 2) beschrieben. Man kommt auf die, von Bütschli nicht berücksichtigte, Vermuthung, dass die Berührung des Paraffinöls mit der alkalischen Eiweisslösung wohl die Ursache dieser Alveolarbildungen sein könnte,

denn es sind ja alle Bedingungen für Schaumbildung gegeben. Ich kann daher der nackten Erwähnung der Alveolarsaumes nicht die Beweiskraft zumessen, die Bütschli ohne weiteres annimmt.

4. Protoplasma.

Die Thatsache, dass lebendes Protoplasma sehr oft enger oder gröber schaumig ist, wurde schon mehrfach (p. 276 und 306) anerkannt, ja man darf hinzufügen, dass solche labile, zur Bildung von Lösungswaben neigende Niederschläge, wie die der Gelatine oder des Caseins, sicher allgemein im Protoplasma verbreitet sind und dessen Neigung zu schaumiger Structur bestimmen. Alles das berechtigt aber Bütschli noch nicht dazu, die feinsten, um 1 μ Durchmesser schwankenden Waben oder Vacuolen als neu entdeckte Elementargebilde aufzufassen, deren Bedeutung mit der des zelligen Baues der Organismen (Bütschli, III, p. 2) auch nur verglichen werden könnte. Denn die Elementarwabe Bütschli's ist kein Elementarorganismus, sondern weiter nichts als ein rein physikalisches Product. Die Zellforschung ist daher nicht bloss berechtigt, sondern ihres eigenen ferneren Fortschrittes wegen sogar dazu verpflichtet, die gesammte Zelle auch weiterhin als einheitlichen Elementarorganismus aufzufassen und Bütschli's Waben in die Reihe der physikalischen Plasmastructuren einzuregistriren. Den zahlreichen Objecten, bei denen Bütschli (III) eine deutliche Waben- oder Schaumstructur des Plasmas nachgewiesen hat, liessen sich gewiss noch viele andere anschliessen, jedoch müsste man streng den Begriff der Wabe respectiren, wovon Bütschli schon in seinem Werk über die mikroskopischen Schäume sich manche kleine Abschwenkung gestattet. Denn nicht jede Gerüststructur ist, wie Bütschli will, verkannter Schaum.

Das homogene Protoplasma soll nach Bütschli (III, p. 170) dadurch aus dem sichtbar wabigen hervorgehen, dass die Waben sich erweitern „mit gleichzeitiger und nothwendiger Verdünnung der Wände bis zu solcher Feinheit, dass sie nicht mehr sichtbar sind“; man könnte auch sagen, das homogene Protoplasma hat eine Structur, wie erstarrte Gelatine oder mit Alkohol gefällte Albumose. Da nun ausführlich bewiesen wurde, dass die homogene Gelatine nicht aus unsichtbaren Elementarwaben aufgebaut sein kann, die von dem Gerinnungsmittel einfach durch Wasserentziehung sichtbar gemacht werden, so wird man auch die Wirkung der Fixirungsmittel auf homogenes Protoplasma anders als Bütschli (III, p. 72) zu beurtheilen haben. Er hält die durch Chromosmiumessigsäure hervortretende maschige Structur an den homogenen Pseudopodien von Gromia (III, Taf. I, Fig. 6) nur für eine verdeutlichte, am lebenden Thier nicht sichtbare. Ebenso soll (III, p. 74, Taf. I, Fig. 10 u. 11) Pikrinschwefelosmiumsäure den Wabenbau der Pseudopodien der Amoeba radiosa bis in die äussersten Enden conserviren und verdeutlichen. Ich erinnere an die p. 284 geschilderte, höchst sonderbare Einwirkung zahlreicher Fixirungsmittel (Platinchlorid, Osmiumsäure, Flemming'sche Lösung, Chromsäure, Formaldehyd, Sublimat) auf die homogene Alkoholfällung der Albumose, die durch das Wasser des Fixirungsmittels zuerst lösungswabig und dann in diesem secundären Zustande conservirt wird (Fig. 19). Umgekehrt scheidet sich erstarrte Gelatine zunächst globulitisch (Chromsäure, Alkohol etc.) aus und wird

secundär wabig. Beide Objecte aber gehen aus dem homogenen in den sichtbar-structurirten Zustand durch Neubildungen über, die von den Fixirungsmitteln erst hervorgerufen werden. Nicht anders wird das homogene Protoplasma sich verhalten.

Ueber das granulirte Protoplasma und die Lage seiner Körnchen, die, wie schon p. 275 erörtert wurde, BÜTSCHLI aus einseitigen und unzureichenden Gründen in die Ecken der Schaumwaben placiren möchte, bitte ich auch die Besprechung der Granulalehre zu vergleichen. Dort wurde schon anerkannt, dass Protoplasma mit granulären Einlagerungen (thierische Drüsen, proteinkörnerhaltige Pflanzenzellen) nothwendig schaumig gebaut sein muss, genau wie sog. vacuolisirtes Protoplasma. Das intergranuläre oder intervacuoläre Plasma würde nach BÜTSCHLI also noch aus Elementarwaben bestehen, die bald unsichtbar sind, bald durch eine feine Zeichnung sich verrathen und gerüstige Structur vortäuschen.

Diese intergranulären Plasmastücke erscheinen, fixirt, bald sehr feinpunktirt gerinnselig, bald mehr homogen; bald mischen sich noch feingranulirte Kettchen und Fädchen in das Bild, dessen Uebereinstimmung mit dem lebenden Zustande sich oft nur schwer feststellen lässt. Vorausgesetzt, dass mit voller Naturtreue fixirt worden ist, so würde sich ergeben, dass das intergranuläre Protoplasma nicht anders gebaut ist, als weniger grob zerklüftetes, und ebenso polymorph sich ausgestaltet, denn es gesellen sich zu den genannten Elementen auch noch fast regelmässig Mikrosomen. Die Räumchen, in denen also gelöste Stoffe als Vacuolen sich sammeln oder als Granula und Proteinkörner oder Stärkekörner etc. sich absetzen, sind nicht etwa erweiterte Elementarwaben oder durch Verschmelzung mehrerer davon entstanden, sondern es sind Neubildungen, genau wie die Vacuolen, die PFEFFER (II, p. 215) künstlich erzeugen konnte, genau wie die Lösungswaben, die in homogen gefällter Albumose oder Gelatine sich öffnen. Der flüssige Aggregatzustand des Protoplasmas, den auch BÜTSCHLI (III, p. 140) anerkennt, treibt zu homogener Beschaffenheit, sobald alle die gelösten Stoffe mit einander mischbar sind und unbehindert diffundiren können. Sobald aber aus irgend einem Grunde Stoffe sich bilden, die zwar in Wasser löslich sind, aber schwer oder gar nicht in das Protoplasma diffundiren können, müssen sie sich in Vacuolen sammeln, deren hydrostatischer Druck von der Art der gelösten Stoffe abhängt. Diese Bedingungen der Vacuolenbildung hat bereits F. SCHWARZ (I, p. 155, 156) im Anschluss an BERTHOLD und PFEFFER entwickelt.

Diesem einen Fall würden sich noch andere anschliessen, wo die Vacuolisirung und Zerklüftung des Protoplasmas auf der Entstehung von unlöslichen Stoffen beruht, sei es dass sie, wie z. B. Oele, überhaupt mit Wasser sich nicht mischen, sei es dass die gerade herrschende chemische Reaction des Protoplasmas oder sein Gehalt an gelösten Salzen ihre Lösung verhindert. Alle diese Beispiele, die sich ja beliebig mannigfaltig noch construiren liessen, erklären das Vorherrschen des schaumigen Baues im Protoplasma, verlangen aber keineswegs, dass dieses stets wabig gebaut sei und jene Elementarstructur besitze, die BÜTSCHLI voraussetzt.

---

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.

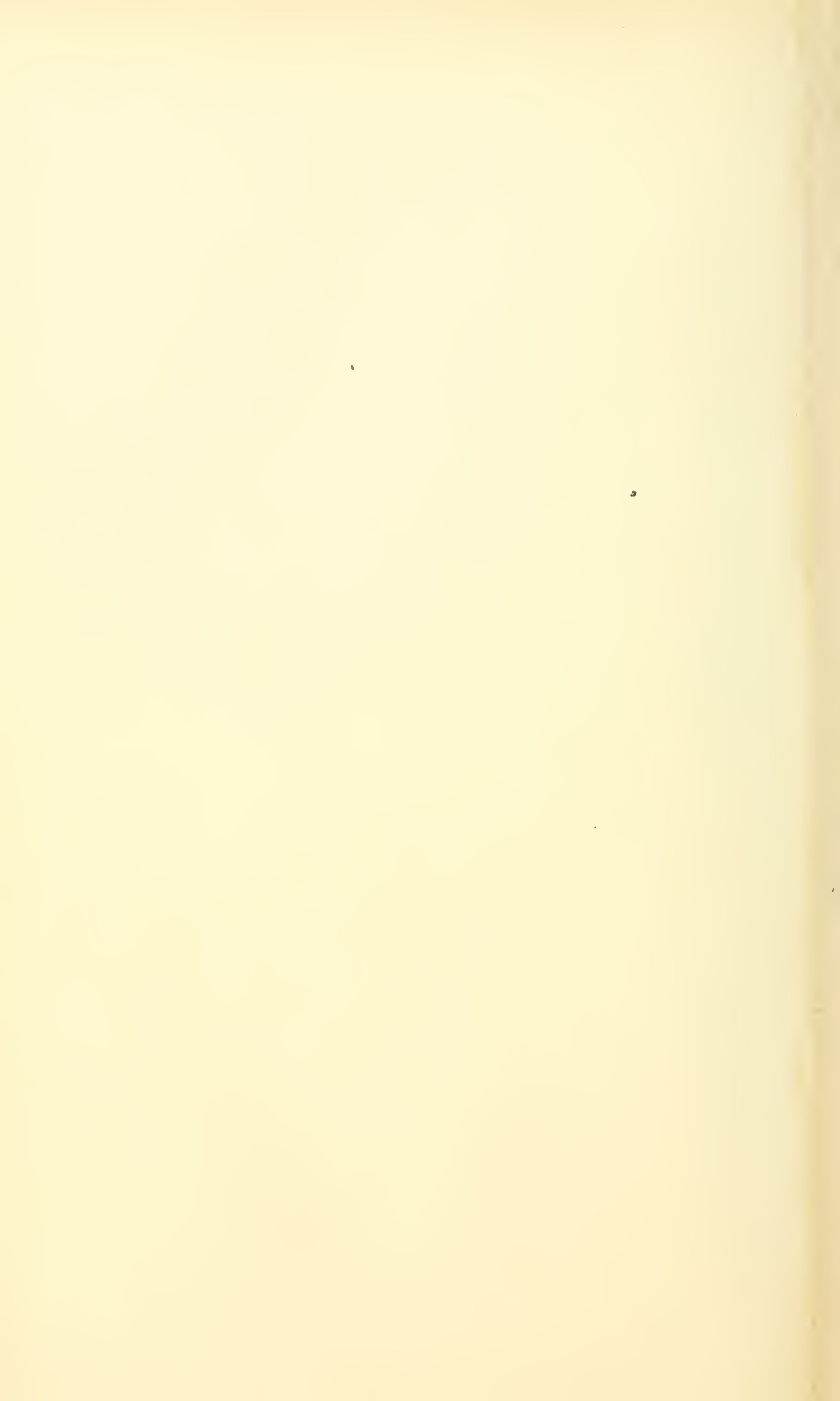
9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16.

17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24.

25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34.

35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42.

Verlag von Gustav Fischer



Tafelerklärung.

Fig. 1 (p. 46). Hämoglobin, 3- und 0,3-proc. gesondert, mit 96-proc. Alkohol gefällt und die aus verschieden grossen Granulis bestehenden Niederschläge auf dem Deckglas gemischt und angetrocknet. Eisenhämatoxylin, mittlere Differenzirung, nachgefärbt mit Tropäolin, grössere Granula schwarz, kleinere, desselben Stoffes, tropäolinfarbig. (600.)

Fig. 2 u. 3 (p. 52). Gemisch No. II, aus 2-proc. Serumalbumin und 2-proc. Hämoglobin in 0,7-proc. Kochsalz, Alkohol gefällt. Granula bestehend aus Hämoglobin, eingebettet in ein Gerinnsel aus Albumin. Fig. 2 ALTMANN'sche Granulafärbung, Fig. 3 Eisenhämatoxylin. (600.)

Fig. 4 (p. 53). Mischung V, aus 2—3-proc. Deuteroalbumose und 1-proc. Serumalbumin, Reaction alkalisch, gefällt mit 1-proc. Platinchlorid. ALTMANN'sche Granulafärbung; fuchsinophile Granula aus Albumose, eingebettet in plasmatische Gerinnsel aus Albumin. (600.)

Fig. 5 (p. 53). Mischung IV, aus 2-proc. Deuteroalbumose und 0,8-proc. Serumalbumin, Reaction gut sauer, gefällt mit ALTMANN's Fixirungsgemisch für Zellgranula und mit der entsprechenden Methode gefärbt. Granula aus Albumose roth, Gerinnsel aus Serumalbumin gelblich, pikrinophil. (600.)

Fig. 6 (p. 56). Gerinnsel aus Serumalbumin, erzeugt durch Fällung einer 2-proc. Lösung mit 0,5-proc. Sublimatlösung; nach gründlichem Auswaschen wurde 10-proc. Albumoselösung, eben sauer, auf dem Filter durchgegossen und nach mehrmaliger Wiederholung und dadurch herbeigeführter Durchtränkung des Gerinnsels mit der Albumoselösung in einem Gläschen mit ALTMANN's Gemisch nachfixirt. Hierdurch wurde die zwischen den Gerinnselchen vertheilte Albumoselösung granulär ausgefällt. Färbung wie bei Fig. 4 u. 5. (600.)

Fig. 7 u. 8 (p. 57). 1-proc. Lösung von Serumalbumin (in 0,2 KOH), in die aus Reinculturen Staphylokokken und Choleravibrionen reichlich eingerührt wurden, dann mit FLEMMING'scher Lösung gefällt und Fig. 7 mit Säurefuchsin-Pikrinalkohol, Fig. 8 mit Eisenhämatoxylin gefärbt und so weit entfärbt, dass nur noch die Kokken, eingebettet in das Serumgerinnsel, gefärbt sind. (600.)

Fig. 9 (p. 54). Mischung VII, 1-proc. Serumalbumin und 2,5-proc. Protalbumose, Reaction schwach alkalisch, gefällt mit FLEMMING'scher Lösung; Eisenhämatoxylin. Protalbumose-Granula schwarz, Albumingerinnsel mit Tropäolin gegengefärbt. (600.)

Fig. 10 (p. 54). Mischung VII, wie bei voriger Figur, aber mit 0,5-proc. Sublimat gefällt; Eisenhämatoxylin. Schwarze Granula bestehen auch hier aus der Albumose, Gerinnsel aus dem Albumin. (1200.)

Fig. 11—18. Chromatophilie-Versuche mit einem Gemisch aus Granulis aller Grössen von Albumosechromat, hergestellt nach dem p. 38 beschriebenen Verfahren. (600.)

Fig. 11 (p. 109). ALTMANN's Granulafärbung, die grossen Granula bis zur Spiegelfärbung differenzirt. (600.)

Fig. 12 (p. 109, 130). Inversion der ALTMANN'schen Granulafärbung durch simultane Doppelfärbung mit einem Gemisch von 5 ccm 0,1-proc. Säurefuchsin und

10 ccm 0,2-proc. Pikrinsäure. Spiegel roth, Schale und kleine Granula pikrinophil. (600.)

Fig. 13 (p. 133). Gemisch von Pikrinsäure und Lichtgrün.

Fig. 14 (p. 32, 134). Säurefuchsin, 0,5-proc., 1 ccm, und Lichtgrün, 0,5-proc., 15 ccm, und 15 ccm Wasser, Färbzeit 6 Min.; Wasser, Trocknen, Balsam.

Fig. 15 (p. 153). BIONDI's Gemisch mit etwas vorherrschendem Methylorange, dessen Säure mit der Methylgrünbase zu dem moosgrünen Farbstoff, der die kleinen Granula und die Ränder der grossen gefärbt hat, zusammengetreten ist. Es ist dieses Grün eine ebensolche „neutrophile" Färbung, wie in den folgenden Figuren mit EHRLICH's Triacid.

Fig. 16 (p. 153). EHRLICH's Triacid, kleinere Granula neutrophil, grosse acidophil, obgleich aus derselben Substanz bestehend.

Fig. 17 (p. 110). FLEMMING's Safranin—Säurealkohol—Gentiana.

Fig. 18 (p. 110). Inversion des vorigen, Gentiana—Säurealkohol—Safranin. Dieselben Inversionen sind auch mit der Platin- oder Formaldehydfärbung der Albumose möglich.

Fig. 19—21. Chromatophilie-Versuche mit einem Granulagemisch aus Platinalbumose, hergestellt nach p. 39. Man vergleiche auch die Darstellung auf p. 81—84. (600.)

Fig. 19 (p. 109). ALTMANN's Granulafärbung, mittlere Differenzirung, um die Vollfärbung der grossen Granula zu zeigen, die durch längere Wirkung des Pikrinalkoholes allgemein bis auf Spiegel sich entfärben lassen, genau wie die Chromatalbumose in Fig. 11.

Fig. 20 (p. 114). Tuberkelbacillenfärbung, mittlere Differenzirung, Vollfärbung der grossen Granula. Man vergleiche dazu die Spiegelfärbung in Fig. 28.

Fig. 21 (p. 141). Gemisch von gereinigtem Methylgrün, 0,5-proc., 10 ccm, + Fuchsin, 0,1-proc., 3 Tropfen, simultane Doppelfärbung.

Fig. 22 (p. 82—84). Dasselbe Farbgemisch, wie bei voriger Figur, aber cyanophile Granula sehr selten, weil die grossen Granula fast ganz fehlen. Es war hier 40-proc. Albumose sofort mit 10-proc. $PtCl_4$ gefällt worden, nicht erst vorher mit 1-proc., wie bei den 3 vorigen. (600.)

Fig. 23 (p. 82—84). Dieselbe Färbung wie vorher, cyanophile Riesenkörner äusserst selten. Fällung von 40-proc. Albumose mit 1-proc. $PtCl_4$. (600.)

Fig. 24—27. Chromatophilie-Versuche mit Granulafällung einer 20-proc. Albumoselösung durch 1-proc. Chromsäure. (600.)

Fig. 24 (p. 153). EHRLICH's Triacid; man vergleiche damit Fig. 16, um zu sehen, dass der Zunahme der kleineren und kleinsten Granula eine scheinbare Zunahme der „neutrophilen Substanz" entspricht, obgleich auch hier alle Granula aus demselben Stoffe bestehen und durch das Farbgemisch einfach nach der Grösse chromatophil sortirt werden. (600.)

Fig. 25 (p. 138). EHRLICH's eosinophiles Gemisch, grosse Granula eosinophil, kleine stark nigrophiler Stich. (600.)

Fig. 26 (p. 112). Safranin—Säurealkohol—Gentiana, Spiegelfärbung. (600.)

Fig. 27 (p. 116). GRAM'sche Bacterienfärbung, violette Spiegel, Schale und kleine Granula mit Tropäolin nachgefärbt. Vergleiche auch Fig. 30. (600.)

Fig. 28 (p. 115, 167). Dieselbe Fällung wie in Fig. 24—27, aber mit 5-proc. Albumoselösung 20 Stunden imprägnirt und mit 1-proc. Chromsäure nachfixirt. Infolge dieser secundären Einlagerung von Albumosechromat sind die Granula noch dichter, substanzreicher geworden und geben nun mit der Tuberkelbacillenfärbung selbst bei sehr starker Differenzirung mit 5-proc. Schwefelsäure prachtvolle Spiegel. (600.)

Fig. 29 u. 30. Spiegelfärbung einer vielgestaltigen Fällung von 40-proc. Albumose durch 10-proc. Formaldehyd.

Fig. 29 (p. 118). Eisenhämatoxylin, Eosin nachgefärbt. Man vergleiche auch die Textfigur Fig. 2, p. 34, und den Abschnitt über die Methoden der Centralkörperforschung (p. 229). (1500.)

Fig. 30 (p. 116). GRAM'sche Färbung; Tropäolin nachgefärbt. (1500.)

Fig. 31—34. Capillardiffusion basischer und saurer Farben in Fliesspapier (p. 127, 128).

Fig. 31. Fuchsin 0,1-proc., der farblose Ring stellt die Ausbreitung des Wassers dar, die rothe Mitte den durch Capillarattraction zurückgehaltenen Farbstoff.

Fig. 32. Säurefuchsin 0,1-proc., Wasser und Farbstoff gleichmässig und zusammen fortschreitend.

Fig. 33. Methylgrün 0,1-proc., verhält sich genau wie Fuchsin, Fig. 31.

Fig. 34. Lichtgrün, 0,1-proc., wie Säurefuchsin, Fig. 32.

Fig. 35—37. Thymusnucleinsäure. (Von Herrn Prof. KOSSEL.)

Fig. 35 (p. 111). Gemischte Fällung von Granulis und Gerinnseln aus Nucleinsäure, 10-proc., durch Platinchlorid (vergl. p. 44). Safranin—Säurealkohol—Gentiana. (1500.)

Fig. 36 (p. 111). Wie vorige, aber umgekehrte Reihenfolge der Farben und dementsprechende Inversion der „Chromatophilie". (1500.)

Fig. 37 (p. 168). Granulafällung von 10-proc. Nucleinsäure mit 10-proc. Platinchlorid (vergl. p. 44); mit 5-proc. Albumose imprägnirt und in BIONDI's Dreifarbengemisch gefärbt, rothe, acidophile Spiegel, grüne Ränder und ebensolche kleine Granula. Ohne Albumose imprägnirt, würde sich alles entsprechend der totalen Acidophobie der Nucleinsäure rein grün gefärbt haben (p. 154). Man vergleiche auch Fig. 15, wo das neutrale Grün an Stelle der reinen Methylgrünfarbe getreten ist. (1500.)

Fig. 38—42. Lupinus albus, Proteinkörner der einen Tag lang eingequellten Samen.

Fig. 38 (p. 304). Fixirt mit ALTMANN's Gemisch für Zellgranula und mit der dazu gehörigen Methode gefärbt. Vollendetes Abbild einer Drüsenzelle, Proteinkörner haben Färbung und Aussehen der fuchsinophilen Zellgranula. (600.)

Fig. 39 (p. 305). Aus demselben Schnitt wie vorige Figur, sog. negatives Granulabild ALTMANN's, bedingt dadurch, dass die Substanz der grossen Proteinkörner fein vacuolig-schaumig fixirt worden ist, nicht compact und homogen zu den vollen Granulis der vorigen Figur. Zur Verdeutlichung dient folgende Figur, während Fig. 39 bei schwacher Vergrösserung nur das Gesammtbild wiedergeben soll. (175.)

Fig. 40 (p. 305). Stück aus einer ebensolchen Zelle wie vorige Figur, sehr stark vergrössert. Die grossen Proteinkörner sind schaumig fixirt, mit verschiedener Grösse der Waben. Die feinen Wabenwände sind um so zarter, je engmaschiger das Korn ist (obere beiden Körner der Figur) und entfärben sich leichter, als das zwischen den Körnern sich hinziehende Cytoplasma, wodurch die negative Granulafärbung entsteht. Je gröber die Vacuolen sind, um so dicker sind, besonders in den Ecken, die Wände, und daher bleiben diese länger roth. (1500.)

Fig. 41 (p. 305). Fixirt mit 7-proc. wässrigem Sublimat; gefärbt mit Säurefuchsin. Die schaumigen Structuren der Proteinkörner wieder sehr schön. Alveolarschicht BÜTSCHLI's sehr deutlich, rechts das kleine Korn nur eine einzige centrale Wabe enthaltend. (1500.)

Fig. 42 (p. 290 u. 305). Fixirt mit FLEMMING'scher Lösung, gefärbt mit Säurefuchsin-Pikrinalkohol; Zelle aus der Keimwurzelbasis mit sichelförmigen Lösungsbildern der Proteinkörner. (600.)

Verzeichniss der Abbildungen im Text.

Literatur.

Altmann, *I. Die Elementarorganismen, 2. Aufl., Leipzig 1894.*

— *II. Einige Bemerkungen über histologische Technik, Arch. Anat. u. Phys., Anat. Abth., 1881.*

— *III. Ueber Kernstructur und Netzstructuren, Arch. Anat. u. Phys., Anat. Abtheil., 1892.*

— *IV. Die Genese der Zelle, Beiträge z. Phys., Festschrift f. C. Ludwig, 1887.*

— *V. Ueber Nucleinsäuren, Arch. Anat. u. Phys., Physiol. Abth., 1889.*

Arnold, J., *I. Theilungsvorgänge an den Wanderzellen, Arch. mikrosk. Anat., 30. Bd.*

Auerbach, *I. Organolog. Studien, I. u. II., Breslau 1874.*

— *II. Zur Kenntniss der thierischen Zellen, Sitzungsber. Berliner Akad., math. phys. Cl., 1890.*

— *III. Ueber einen sexuellen Gegensatz in der Chromatophilie der Keimsubstanzen, Sitzungsber. Berl. Akad., 1891.*

Ballowitz, *I. Zur Kenntniss der Zellsphäre, Arch. Anat. u. Phys., Anat. Abth., 1898.*

Belajeff, *I. Ueber die Cilienbildner in den spermatogenen Zellen, Ber. d. Deutsch. bot. Ges., 16. Bd., 1898.*

van Beneden *et* ***Neyt***, *I. Nouvelles recherches sur la fécondation et la division mitosique chez l'Ascaris megalocéphale, Bruxelles 1887, Bull. Acad. Roy. Belg., 3. Ser. T. 14, 1887.*

Berthold, *I. Studien über Protoplasmamechanik, 1886.*

Biondi, *I. Neue Methode der mikroskopischen Untersuchung des Blutes, Arch. mikrosk. Anat., 31. Bd.*

Blum, *I. Ueber eine neue Klasse von Verbindungen der Eiweisskörper, Zeitschr. physiol. Chem., 22. Bd.*

Bogomolow, *I. Ueber die Anwendung von Farbstoffen zur Erkennung und Unterscheidung verschiedener Eiweissarten, Petersburger med. Wochenschr., 1894, No. 34.*

Boveri, *I. Die Bildung der Richtungskörper bei Ascaris etc., Zellenstud., H. 1.*

— *II. Die Befruchtung und Theilung des Eies von Ascaris megalocephala, Zellstud., H. 2.*

— *III. Ueber das Verhalten der Centrosomen bei der Befruchtung des Seeigeleies, Verhandl. Phys.-med. Ges. Würzburg, 29. Bd., 1895.*

Brass, A., *I. Biologische Studien. H. 1, Halle 1883.*

Brücke, E., *I. Die Elementarorganismen, abgedruckt in Ostwald's Classikern der exact. Wissenschaft., No. 95.*

Bütschli, *I. Studien über die ersten Entwickelungsvorgänge der Eizelle, die Zelltheilung und die Conjugation der Infusorien, Abh. Senckenberg. Ges., 10. Bd., 1876.*

— *II. Ueber die künstliche Nachahmung der karyokinetischen Figur, Verhandl. Med.-naturwissensch. Ver., 5. Bd., Heidelberg 1892, p. 28—41.*

— *III. Untersuchungen über mikroskopische Schäume und das Protoplasma, Leipzig 1892.*

— *IV. Untersuchungen über Structuren etc., Leipzig 1898.*

Carnoy, *I. La cytodiérèse chez les Arthropodes, La Cellule, T. 1, 1885.*

— *II et* ***Lebrun***, *La Cellule, T. 12 et 13.*

Crato, *I. Morpholog. und mikrochem. Untersuchung über die Physoden, Bot. Zeitung, 1893.*

— *II. Beiträge z. Anatomie u. Physiologie des Elementarorganismus, Cohn's Beitr. z. Biol., 7. Bd., 1896.*

Cuénot, I. *Études physiologiques sur les Crustacées Décapodes, Arch. de Biologie, T. 13, 1893.*

Davis, Bradley Moore, 1. *Kerntheilung in den Tetrasporenmutterzellen bei Corallina officinalis L. var. mediterranea, Ber. Deutsch. bot. Ges., 16. Bd., 1898.*

Demoor, I. *Contribution à l'étude de la physiologie de la cellule, Arch. de Biologie, T. XIII, 1893.*

Drüner, I. *Zur Morphologie dar Centralspindel, Jenaische Zeitschr. f. Naturw., 28. Bd., 1894.*

— II. *Studien über den Mechanismus der Zelltheilung, ibid., 29. Bd., 1895.*

— III. *Beiträge zur Kenntniss der Kern- und Zelldegeneration und ihrer Ursache, ibid., 28. Bd., 1894.*

v. Ebner, 1. *Zur Spermatogenese bei den Säugethieren, Arch. mikrosk. Anat., 31. Bd.*

Edinger, I. *Ueber die Reaktion der lebenden Magenschleimhaut, Pflüger's Archiv, 29. Bd., 1882.*

veer Eecke, I. *Modification de la cellule pancréatique, Arch. de Biologie, T. 13, 1893.*

Ehrlich, P., I. *Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leucocyten, Zeitschr. f. klin. Med., 1. Bd., 1880.*

— II. *Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes, I. Theil, Berlin 1891.*

— III. *Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung, Charité-Annalen, 11. Bd., 1886.*

v. Erlanger, I. *Beiträge zur Kenntniss der Structur des Protoplasmas, der karyokinetischen Spindel und des Centrosoms, Arch. mikrosk. Anat., 49. Bd., 1897.*

Fick, A., I. *Die medicinische Physik, 3. Aufl., 1885.*

Fick, R., I. *Bemerkungen zu dem Heidenhain'sehen Spannungsgesetz, Arch. Anat. u. Phys., Anat. Abth., 1897.*

Fischer, A., I. *Zur Kritik der Fixirungsmethoden und der Granula, Anat. Anz., 9. Bd., 1894.*

— II. *Neue Beiträge zur Kritik der Fixirungsmethoden, Anat. Anz., 10. Bd., 1895.*

— III. *Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bacterien, Jena 1897.*

Flemming, Walther, I. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung, Leipzig 1882.*

— II. *Amitotische Kerntheilung im Blasenepithel des Salamanders, Arch. mikrosk. Anat., 34. Bd.*

— III. *Ueber Theilung und Kernformen bei Leucocyten und über deren Attractionssphären, ibid., 37. Bd., 1891.*

— IV. *Studien in der Entwicklungsgeschichte der Najaden, Sitzungsber. Wiener Akad. math.-nat. Cl., III. Abth., 71. Bd., 1875.*

— V. *Beobachtungen über die Beschaffenheit des Zellkerns, Arch. mikrosk. Anat., 13. Bd., 1877.*

— VI. *Ueber Epithelregeneration und sog. freie Kernbildung, ibid., 18. Bd., 1880.*

— VII. *Beiträge zur Kenntniss der Zelle, I., ibid., 16. Bd., 1879.*

— VIII. *Zur Kenntniss der Gerüste im Zellkern und ihrer Veränderungen durch chromsaure Salze, Centralbl. f. med. Wiss., 1878.*

— IX. *Beiträge zur Kenntniss der Zelle, III., Arch. mikrosk. Anat., 20. Bd., 1882.*

— X. *Beiträge zur Kenntniss der Zelle, II., ibid., 18. Bd., 1880.*

— XI. *Ueber die Wirkung von Chromosmiumessigsäure auf Zellkerne, ibid., 45. Bd., 1895.*

— XII. *Ueber die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel, Arch. Anat. u. Phys., Anat. Abth., 1885.*

— XIII. *Zur Mechanik der Zelltheilung, Arch. mikrosk. Anat., 46. Bd., 1895.*

— XIV. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte von Merkel und Bonnet, Abschnitt Zelle, 3. Bd., 1893.*

— XV. *Weitere Beobachtungen über die Entwicklung der Spermatozoen des Salamanders, Arch. mikrosk. Anat., 31. Bd.*

— XVI. *Studien über die Regeneration der Gewebe, ibid., 24. Bd.*

— XVII. *Ueber den Bau der Bindegewebszellen und Bemerkungen über die Structur der Zellsubstanz im Allgemeinen, Zeitschr. f. Biolog., 34. Bd., 1897.*

— XVIII. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte, Morphologie der Zelle, 1897.*

— XIX. *Dasselbe, 1898.*

— XX. *Neue Beiträge zur Kenntniss der Zelle, II. Theil, Arch. mikrosk. Anat., 37. Bd., 1891.*

Flesch, M., I. *Bemerkungen zur Kritik der Tinctionspräparate, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 2. Bd., 1885.*

Fol, I. *Recherches sur la fécondation et le commencement de l'hénogénie chez divers anim., Mémoir. de la Societ. de phys· et d'hist. nat. de Genève, 1879, T. 26.*
Fränkel, I, *Beiträge zur Physiologie der Magendrüsen, Pflüger's Arch., 48. Bd., 1891.*
Freund u. Obermayer, I. *Ueber die chemische Zusammensetzung des leucämischen Blutes, Zeitschr. f. phys. Chemie, 15. Bd., 1891.*
Galeotti, I. *Beitrag zur Kenntniss der Secretionserscheinungen in den Epithelzellen der Schilddrüse, Arch. mikrosk. Anat., 48. Bd., 1897.*
Georgievics, I. *Ueber das Wesen des Färbeprocesses, Sitzungsber. math.-nat. Cl. Wiener Akad., 103. Bd., Abth. IIb, 1894.*
Gierke, I. *Färberei zu mikroskopischen Zwecken, I., Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1. Bd., 1884.*
— II. *Färberei zu mikroskopischen Zwecken, II., ibid., 2. Bd., 1885.*
Gottstein, I. *Ueber Entfärbung gefärbter Zellkerne und Mikroorganismen durch Salzlösungen, Fortschr. d. Med., 3. Bd., 1885.*
Griesbach, I. *Weitere Untersuchungen über Azofarbstoffe behufs Tinction menschlicher und thierischer Gewebe, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 3. Bd., 1886.*
— II. *Das Metanilgelb, ibid., 4. Bd., 1887.*
Gris, A., I. *Recherches sur la moelle des plantes ligneuses, Annal. sc. nat. Bot., 5. Sér., T. 14, 1872.*
Gruber, I. *Ueber Kern und Kerntheilung bei den Protozoen, Zeitschr. wiss. Zool., 40. Bd., 1884.*
Gscheidlen, *Ueber die chemische Reaction der nervösen Centralorgane, Pflüger's Arch., 8. Bd., 1874.*
Guignard, I. *Nouvelles recherches sur la fécondation, Ann. sc. nat., Bot., 7. Sér., T. 14, 1891.*
— II. *Recherches sur la structure et la division du noyau cellulaire chez les végétaux, ibid., 6. Sér., T. 17, 1884.*
— III. *Les centres cinétiques chez les végétaux, ibid., 8. Sér., T. 6, 1898.*
— IV. *Sur l'origine des sphères directrices. Journ. de Bot., T. 8, 1894.*
Haberlandt, I. *Ueber die Beziehungen zwischen Function und Lage des Zellkernes in der Pflanze, Jena 1887.*
Häcker, I. *Die Keimbahnen von Cyclops, Arch. mikrosk. Anat., 49. Bd., 1897.*
— II. *Die Vorstadien der Eireifung, ibid., 45. Bd.*
Hammer, B., I. *Ueber das Verhalten der Kerntheilungsfiguren in der menschlichen Leiche, Diss. Berlin 1891.*
Hansemann, I. *Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung, Virchow's Arch., 119. Bd., 1890.*
— II. *Ueber pathologische Mitosen, ibid., 123. Bd., 1891.*
Harper, I. *Kerntheilung und freie Zellbildung im Ascus, Jahrb. wiss. Bot., 30. Bd.*
— II. *Kerntheilung im Ascus, Ber. Deutsch. bot. Ges., 13. Bd., 1895.*
Hauser, I. *Ein Beitrag zur Lehre von der pathologischen Fibringerinnung, Deutsch. Arch. f. klin. Med., 50. Bd., 1892.*
Hefftег, I. *Beiträge zur Chemie des quergestreiften Muskels mit Berücksichtigung der Todtenstarre und einigen Vergiftungen, Arch. experim. Path. u. Pharmak., 31. Bd., 1893.*
Heidenhain, M., I. *Neue Untersuchungen über die Centralkörper und ihre Beziehungen zum Kern- und Zellenprotoplasma, Arch. mikrosk. Anat., 43. Bd., 1894.*
— II. *Kern und Protoplasma, Festschr. f. Köllicker, 1892.*
— III. *Beiträge zur Kenntniss der Topographie und Histologie der Kloake und ihrer drüsigen Adnexa bei den einheimischen Tritonen, Arch. mikrosk. Anat., 35. Bd., 1890.*
— IV. *Noch einmal über die Darstellung der Centralkörper durch Eisenhämatoxylin etc., Zeitschr. wiss. Mikrosk., 13. Bd., 1896.*
— V. *Neue Erläuterungen zum Spannungsgesetz der centrirten Systeme, Morph. Arbeit., herausg. von Schwalbe, 7. Bd., 1897.*
— VI. *Ueber die Mikrocentren mehrkerniger Riesenzellen und die Centralkörperfrage im Allgemeinen, Morph. Jahrb., 7. Bd.*
Heidenhain, R., I. *Beiträge zur Histologie und Physiologie der Dünndarmschleimhaut, Pflüger's Arch., 43. Bd., Suppl. 1888.*
— II. *Beiträge zur Kenntniss des Pankreas, ibid., 10. Bd., 1875.*
Heine, I. *Die Mikrochemie der Mitose, zugleich eine Kritik mikrochemischer Methoden, Zeitschr. phys. Chemie, 21. Bd., 1895.*
— II. *Ueber die Molybdänsäure als mikroskopisches Reagens, ibid., 22. Bd.*
Held, Hans, I. *Beiträge zur Structur der Nervenzellen und ihrer Fortsätze, I., Arch. f. Anat. u. Phys., Anat. Abth., 1895.*
— II. *Beiträge etc., II., ibid., 1897.*

Held, Hans, *III. Beobachtungen am thierischen Protoplasma, I. Drüsengranula und Drüsenprotoplasma, Arch. f. Anat. u. Phys., Anat. Abth., 1899.*
Henking, *I. Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten, III., Zeitschr. wiss. Zool., 54. Bd., 1892.*
— *II. Künstliche Nachbildung von Kerntheilungsfiguren, Arch. mikrosk. Anat., 41. Bd., 1893.*
— *III. Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten, II., Zeitschr. wiss. Zool., 51. Bd., 1891.*
Herla, *I. Étude des variations de la mitose chez l'Ascaride mégalocéphale, Arch. de Biol., T. 13, 1893.*
Hermann, *I. Beiträge zur Histologie des Hodens, Arch. mikrosk. Anat., 34. Bd., 1889.*
— *II. Beitrag zur Lehre von der Entstehung der karyokinetischen Spindel, ibid., 37. Bd., 1891.*
— *III. Beiträge zur Kenntniss der Spermatogenese, ibid., 50. Bd., 1897.*
Hertwig, O., *I. Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies, Morph. Jahrb., 1. Bd., 1876.*
— *II. Beiträge etc., II. Theil, ibid., 3. Bd., 1877.*
— *III. Beiträge etc., III. Theil, ibid., 4. Bd., 1878.*
— *IV. Ueber das Vorkommen spindeliger Körper im Dotter junger Froscheier, ibid., 10. Bd., 1885.*
— *V. Die Zelle und die Gewebe, 1. Bd. 1893.*
Hertwig, O. *u.* **R.**, *I. Ueber den Befruchtungs- und Theilungsvorgang des thierischen Eies unter dem Einfluss äusserer Agentien, Unters. z. Morph. u. Phys. d. Zelle, H. 5, 1887.*
Hertwig, R., *I. Ueber Befruchtung und Conjugation, Verhandl. d. Deutsch. zool. Ges., 2. Bd., 1892.*
His, W., *I. Ueber Zellen- und Syncytienbildung, Studien an Salmonidenkeimen, Abh. Kgl. sächs. Ges. Wiss., math.-nat. Cl., 24. Bd., 1898.*
Hofmeister, Fr., *I. Zur Lehre vom Pepton, IV. Ueber die Verbreitung des Peptons im Thierkörper, V. Das Verhalten des Pepton in der Magenschleimhaut, Zeitschr. physiol. Chemie, 6. Bd., 1882.*
— *II. Untersuchungen über Resorption und Assimilation der Nährstoffe, Arch. experim. Pathol. u. Pharmak., 19. Bd., 1885.*
— *III. Zur Lehre vom Pepton, II., Ueber das Pepton des Eiters, Zeitschr. physiol. Chemie, 4. Bd., 1880.*
— *IV. Ueber die Zusammensetzung des krystallisirten Eieralbumins, ibid., 16. Bd., 1892.*
Hofmeister, W., *I. Die Lehre von der Pflanzenzelle, Leipzig 1867.*
Hoppe-Seyler, *I. Ueber die chemische Zusammensetzung des Eiters, Med.-chem. Unters., H. 4.*
Hueppe, *I. Die Methoden der Bakterienforschung, 5. Aufl., 1891.*
Hummel-Knecht, *I. Die Färberei und Bleicherei der Gespinnstfasern, 2. Aufl., 1891.*
Humphrey, *I. Nucleolen und Centrosomen, Ber. d. Deutsch. bot. Ges., 12. Bd., 1894.*
Janošik, *I. Ueber die Structur der Säugethiereizelle, Czechisch. Akad. d. Wiss. Prag, 1893.*
Ikeno, S., *I. Untersuchungen über die Entwicklung der Geschlechtsorgane und den Vorgang der Befruchtung bei Cycas revoluta, Jahrb. wiss. Bot., 32. Bd., 1898.*
Israel, *I. Ueber Doppelfärbung mit Orceïn, Virchow's Arch., 105. Bd., 1886.*
Juel, *I. Die Kerntheilungen in den Pollenmutterzellen von Hemerocallis fulva und die bei denselben auftretenden Unregelmässigkeiten, Jahrb. wiss. Bot., 30. Bd.*
Karsten, G., *I. Ueber Beziehungen der Nucleolen zu den Centrosomen bei Psilotum triquetrum, Ber. Deutsch. bot. Ges., 11. Bd., 1893.*
Klemm, *I. Desorganisationserscheinungen der Zelle, Jahrb. wiss. Bot., 28. Bd.*
Klien, *I. Ueber die Beziehungen der Russel'schen Fuchsinkörperchen zu den Altmann-schen Zellgranulis, Ziegler's Beitr. z. path. Anat., 11. Bd.*
Knecht, Rawson *und* **Löwenthal**, *I. Handb. der Färberei der Spinnfasern, Berlin 1895.*
Knecht, *I. Zur Kenntniss der chemischen Vorgänge, welche beim Färben von Wolle und Seide mit den basischen Theerfarben stattfinden, Ber. Deutsch. chem. Ges., 21. Bd., 1888, p. 1556.*
— *II. und* **Appleyard.** *Zur Theorie des Färbens, ibid., 22. Bd., 1889, p. 1120.*
Koch, Robert, *I. Ueber neue Tuberkulinpräparate, 1897, Sonderabdruck aus Deutsch. med. Wochenschr., 1897, No. 14.*
Korschelt, *I. Ueber die Structur der Kerne in den Spinndrüsen der Raupen, Arch. mikrosk. Anat., 47. Bd., 1896.*
— *II. Ueber den Bau der Kerne in den Spinndrüsen der Raupen, ibid., 49. Bd., 1897.*
— *III. Beiträge zur Morphologie u. Physiologie des Zellkernes, Zoolog. Jahrb., Abth. f. Anat., 4. Bd., 1890.*

Kossel, *I u.* **Neumann**, *Ueber Nucleinsäure u. Thymussäure, Zeitschr. physiol. Chemie, 22. Bd.*
Kossel, *II. Ueber die basischen Stoffe des Zellkernes, Sitzungsber. Berliner Akad., 18. u. 19. Bd., 1896.*
— *III. Ueber das Nuclein der Hefe, II, Zeitschr. physiol. Chemie, 4. Bd., 1880.*
Kostanecki, *I. Ueber die Bedeutung der Polstrahlung während der Mitose u. ihr Verhältniss zur Theilung des Zellleibes, Arch. mikrosk. Anat., 49. Bd., 1897.*
— *II. Die Befruchtung des Eies von Myzostoma glabrum, ibid., 51. Bd., 1898.*
Krasser, *I. Ueber die Structur des ruhenden Zellkernes, Sitzungsber. Wiener Akad., math.-nat. Cl., 101. Bd., 1892, Abth. I.*
Krause, R., *I. Zur Histologie der Speicheldrüse, Arch. mikrosk. Anat., 45. Bd.*
Krehl, *I. Ein Beitrag zur Fettresorption, Arch. Anat. u. Physiol., Anat. Abth., 1890.*
Kühne, *I. Erfahrungen über Albumosen u. Peptone, Zeitschr. f. Biologie, 29. Bd., 1892.*
— *II. Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität, Leipzig 1864.*
— *III u.* **Chittenden**, *Ueber die Peptone, Zeitschr. f. Biologie, 22. Bd., 1886.*
Kultschitzky, *I. Zur Kenntniss der modernen Fixirungs- u. Conservirungsmittel, Zeitschr. wissensch. Mikrosk., 4. Bd., 1887.*
Landsberger, *Ueber den Nachweis der sauren Reaction des Muskels mit Hilfe von Phenolphtalein, Pflüger's Arch., 50. Bd., 1891.*
Lee, Bolles, *I. Les cinèses spermatogénétiques chez l'Helix pomatia, Cellule, Tome 13, 1897.*
Lee *u.* **Mayer**, *I. Grundzüge der mikrosk. Technik, Berlin 1898.*
v. Lenhossék, *I. Untersuchungen über Spermatogenese, Arch. mikrosk. Anat., 51. Bd., 1898.*
Lidforss, *I. Zur Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, Acta Soc. Reg. Physiogr. Lundensis, 8. Bd., 1897.*
Liebermann, Leo, *I. Studien über die chemischen Processe in der Magenschleimhaut, Pflüger's Arch., 50. Bd., 1891.*
— *II. Notiz über das chemische Verhalten des Nierenparenchyms, Pflüger's Arch., 50. Bd., 1891.*
Lilienfeld, *I. Ueber die Wahlverwandtschaft der Zellelemente zu gewissen Farbstoffen, Arch. Anat. u. Phys., Phys. Abth., 1893.*
— *II. Ueber die Farbenreaction des Mucines, ibid., 1893.*
— *III. Zur Chemie der Leucocyten, Zeitschr. physiol. Chemie, 18. Bd., 1894.*
— *IV u.* **Monti**, *Ueber die mikrochemische Localisation des Phosphors in den Geweben, ibid., 17. Bd., 1893.*
Loew, O., *I. Die chemische Energie der lebenden Zellen, München 1899.*
Löwit, *I. Ueber Neubildung und Beschaffenheit der weissen Blutkörperchen, Ziegler's Beitr., 10. Bd., 1891.*
— *II. Beiträge zur Lehre von der Blutgerinnung, II. Sitzungsber. Wiener Akad., nat. Cl., 90. Bd., 1884.*
— *III. Die Anordnung und Neubildung von Leucoblasten u. Erythroblasten in den blutzellenbildenden Organen, Arch. mikrosk. Anat., 38. Bd., 1891.*
— *IV. Ueber Neubildung und Zerfall weisser Blutkörperchen, Wiener Sitzungsberichte, 92. Bd., III. Abth., 1885.*
Lustig *u.* **Galeotti**, *I. Cytologische Studien über pathologische menschliche Gewebe, Ziegler's Beitr., 14. Bd., 1893.*
Mark, *I. Bull. Museum comp. Zool. Harvard College, 6. Bd., 1881, Cambridge, Mass.*
Mayer, Paul, *I. Beruht die Färbung der Zellkerne auf einem chemischen Vorgange oder nicht? Anat. Anz., 13. Bd., 1897.*
— *II. Ueber Schleimfärbung, Mittheil. zoolog. Stat. Neapel, 12. Bd., 1896.*
— *III. Ueber das Färben mit Hämatoxylin und Ueber das Färben mit Karmin, ibid., 10. Bd., 1891.*
Merk, *I. Ueber die Schleimabsonderung an der Oberhaut der Forellenembryonen, Sitzungsber. Wiener Akad., 93. Bd., III. Abth., 1886.*
Metzner, *I. Beiträge zur Granulalehre, Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894.*
— *II. Ueber die Beziehungen der Granula zum Fettansatz, ibid., Anat. Abth., 1890.*
Meves, *I. Ueber die Entwicklung der männlichen Geschlechtszellen von Salamandra maculosa, Arch. mikrosk. Anat., 48. Bd., 1897.*
— *II. Zur Structur der Kerne in den Spinndrüsen der Raupen, ibid., 48. Bd.*
— *III. Ueber eine Metamorphose der Attractionssphäre in den Spermatogonien von Salamandra maculosa, ibid., 44. Bd., 1894.*
— *IV. Ueber Structur und Histogenese der Samenfäden von Salamandra maculosa, ibid., 50. Bd., 1897.*
— *V. Ueber die Zellen des Sesambeines in der Achillessehne des Frosches u. über ihre Centralkörper, ibid., 45. Bd., 1895.*

Meves, *VI. Ueber das Verhalten der Centralkörper bei der Histogenese der Samenfäden von Mensch und Ratte, Mittheil. d. Vereins Schlesw.-Holst. Aerzte, 6. Bd., 1898.*

Miescher, *I. Recherches sur la constitution chimique des spermatozoides du saumon du Rhin, Arch. des sciences phys. et nat., T. 28, 1892, Genève.*

— *II. Gesammelte Arbeiten, herausgegeben von seinen Freunden, Leipzig 1897.*

— *III. Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch, herausgegeben von Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., 37. Bd. Auch in No. II, worauf sich die Citate beziehen.*

Milroy, *I. Ueber die Eiweiss-Verbindungen der Nucleinsäure und Thyminsäure und ihre Beziehungen zu den Nucleinen und Paranucleinen, Zeitschr. physiol. Chemie, 22. Bd.*

Miura, *I. Ueber pathol. Peptongehalt der Organe, Virchow's Arch., 101. Bd., 1885.*

Mohl, H. v., *I. Grundzüge der Anatomie und Physiologie der vegetabil. Zelle, Braunschweig 1851.*

Mottier, *I. Beiträge zur Kenntniss der Kerntheilung in den Pollenmutterzellen, Jahrb. wiss. Bot., 30. Bd.*

— *II. Ueber das Verhalten der Kerne bei der Entwicklung des Embryosackes etc., ibid., 31. Bd., 1898.*

— *III. Das Centrosom bei Dictyota, Ber. Deutsch. bot. Ges., 16. Bd., 1898.*

Müller, Erik, *I. Drüsenstudien, Arch. Anat. u. Physiol., Anat. Abth., 1896.*

Nencki, *I. Ueber das Parahämoglobin, Arch. experim. Pathol. u. Pharm., 20. Bd., 1886.*

Neumeister, *I. Bemerkungen zur Chemie der Albumosen u. Peptone, Zeitschr. f. Biologie, 24. Bd., 1888.*

— *II. Ueber die Reactionen der Albumosen u. Peptone, ibid., 26. Bd., 1890.*

— *III. Lehrbuch der physiologischen Chemie, 1. Bd., 1893.*

— *IV. Lehrbuch der physiologischen Chemie, 2. Bd., 1895.*

— *V. Ueber die Einführung der Albumosen und Peptone in den Organismus, Zeitschr. f. Biologie, 24. Bd., 1888.*

— *VI. Ueber das Vorkommen und die Bedeutung eines eiweisslösenden Enzymes in jugendlichen Pflanzen, ibid., 30. Bd., 1894.*

Niessing, C., *I. Die Betheiligung von Centralkörper u. Sphäre am Aufbau des Samenfadens bei Säugethieren, Arch. mikrosk. Anat., 48. Bd., 1897.*

Niessing, G., *I. Zellenstudien, ibid., 46. Bd., 1895.*

Nietzki, R., *I. Chemie der organischen Farbstoffe, 2. Aufl., 1894.*

Nussbaum, *I. Ueber die Theilbarkeit der lebendigen Materie, Arch. mikrosk. Anat., 26. Bd.*

Ogata, *I. Die Veränderung der Pankreaszellen bei der Secretion, Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1883.*

Osterhout, *I. Ueber Entstehung d. karyokinetischen Spindel bei Equisetum, Jahrb. wiss. Bot., 30. Bd.*

Ostwald, W., *I. Die wissenschaftlichen Grundlagen der analytischen Chemie, 1. Aufl., 1894.*

— *II. Lehrbuch der allgemeinen Chemie, 1. Bd., 2. Aufl., 1891.*

Palla, *I. Ueber ein neues Organ der Conjugatenzelle, Ber. Deutsch. bot. Ges., 12. Bd., 1894.*

Peremeschko, *I. Ueber die Theilung der thierischen Zellen, Arch. mikrosk. Anat., 16. Bd., 1879.*

Pfeffer, W., *I. Pflanzenphysiologie, 1. Bd., 2. Aufl., 1897.*

— *II. Zur Kenntniss der Plasmahaut und der Vacuolen, nebst Bemerkungen über den Aggregatszustand des Protoplasmas und über osmotische Vorgänge, Abhandl. Königl. sächs. Ges. d. Wiss., math.-phys. Cl., 16. Bd., 1890.*

— *III. Osmotische Untersuchungen, Leipzig 1877.*

Pfitzner, *I. Nervenendigungen im Epithel, Morphol. Jahrb., 7. Bd., 1882.*

— *II. Zur Kenntniss der Kerntheilung bei den Protozoen, ibid., 11. Bd., 1886.*

Piersol, *I. Beiträge zur Histologie der Harder'schen Drüse der Amphibien, Arch. mikrosk. Anat, 29. Bd., 1887.*

Posner, *I. Farbenanalytische Untersuchungen, Verhandl. d. XII. Congr. f. inn. Med., Wiesbaden 1893, p. 292—297.*

Przesmycki, *I. Ueber die Zellkörner bei den Protozoen, Biolog. Centralbl., 14. Bd., 1894.*

Pringsheim, *I. Untersuchungen über den Bau und die Bildung der Pflanzenzellen, 1854.*

Rabl, H., *I. Untersuchungen über die menschliche Oberhaut und ihre Anhangsgebilde mit besonderer Rücksicht auf die Verhornung, Arch. mikrosk. Anat., 48. Bd., 1897.*

— *II. Ueber Zelltheilung, Morphol. Jahrb., 10. Bd., 1885.*

Raciborski, *I. Kritisches Referat über Lilienfeld und Monti's Phosphorreaction, Bot. Ztg., 1893, 2. Abth., p. 245.*
— *II. Ueber die Chromatophilie der Embryosackkerne, Anzeiger d. Akad. d. Wiss. in Krakau, 1893.*
Rawitz, B., *I. Leitfaden für histologische Untersuchungen, 2. Aufl., 1895.*
— *II. Centrosoma und Attractionssphäre in der ruhenden Zelle des Salamanderhodens, Arch. mikrosk. Anat., 44. Bd., 1895.*
— *III. Bemerkungen über Mikrotomschneiden und über das Färben mikroskopischer Präparate, Anat. Anz., 13. Bd., 1897.*
— *IV. Ueber die Zellen in den Lymphdrüsen von Macacus cynomolgus, Arch. mikrosk. Anat., 45. Bd.*
Reinke, Friedr., *I. Zellstudien, Arch. mikrosk. Anat., 43. Bd., 1894.*
— *II. Zellstudien, II, ibid., 44. Bd., 1895.*
Reinke, J., u. Rodewald, *I. Die chemische Zusammensetzung des Protoplasmas von Aethalium septicum, Untersuch. aus dem bot. Laborat. der Universität Göttingen, H. 2, 1881.*
Rhumbler, L., *I. Versuch einer mechanischen Erklärung der indirecten Zell- u. Kerntheilung, I. Theil, Die Cytokinese, Arch. f. Entwicklungsmech., 3. Bd., 1896.*
— *II. Stemmen die Strahlen der Astrosphäre oder ziehen sie? ibid., 4. Bd., 1897.*
Rosen, *I. Beiträge zur Kenntniss der Pflanzenzellen, I u. II, Beitr. z. Biolog., 5. Bd.*
— *II. Beiträge zur Kenntniss etc., III, ibid., 7. Bd.*
Russel, *I. An adress on a characteristic organism of cancer, British medical Journal, 1890, Vol. 2.*
Sachs, J., *I. Ueber das Wachsthum der Haupt- und Nebenwurzeln, Arb. bot. Inst. Würzburg, 1. Bd.*
Sauer, *I. Neue Untersuchungen über das Nierenepithel etc., Arch. mikrosk. Anat., 46. Bd., 1895.*
Schaper, A., *I. Zur Sublimatfixation, Anat. Anz., 13. Bd., 1897.*
Schenk, H., *I. Ueber Conservirung von Kerntheilungsfiguren, Dissert. Bonn 1890.*
Schleicher, *I. Die Knorpelzelltheilung, Arch. mikrosk. Anat., 16. Bd., 1879.*
Schmid, G. C., *Ueber Adsorption, Zeitschr. f. physik. Chemie, 15. Bd., 1894.*
Schmidt-Mülheim, *I. Untersuchungen über die Verdauung der Eiweisskörper, Arch. Anat. u. Phys., Phys. Abth., 1879.*
Schneider, C, *Untersuchungen über die Zelle, Arb. a. d. zool. Inst. d. Univers. Wien, 9. Bd., H. 2, 1891.*
Schottländer, *Beiträge zur Kenntniss des Zellkernes in den Sexualzellen der Kryptogamen, Beiträge z. Biolog., 6. Bd., 1893.*
Schütt, *I. Die Peridineen der Plankton-Expedition, I. Theil, 1895.*
Schultze, O., *I. Untersuchungen über die Reifung und Befruchtung des Amphibieneies, I, Zeitschr. wiss. Zool., 45. Bd., 1887.*
Schulze, Max, *I. Das Protoplasma der Rhizopoden und Pflanzenzellen, Leipzig 1863.*
Schwarz, Fr., *I. Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. Cohn's Beitr., 5. Bd., 1. H., 1887.*
Shaw, Walter, *I. Ueber die Blepharoplasten bei Onoclea und Marsilia, Ber. Deutsch. bot. Ges., 16. Bd., 1898.*
Sobotta, *I. Die Reifung und Befruchtung des Eies von Amphioxus lanceolatus, Arch. mikrosk. Anat., 50. Bd., 1897.*
Solger, B., *I. Ueber den feineren Bau der Glandula submaxillaris des Menschen mit besonderer Berücksichtigung der Drüsengranula, Festschr. f. C. Gegenbaur, 2. Bd., 1896.*
Stadelmann, *I. Untersuchungen über die Peptonurie, Wiesbaden 1894.*
Starke, *I. Ueber die Fettgranula in der Leber von Rana esculenta, Arch. Anat. u. Phys., Anat. Abth., 1891.*
— *II. Ueber Fettgranula und eine neue Eigenschaft des Osmiumtetroxydes, ibid., Phys. Abth., 1895.*
Stolnikow, *Vorgänge in den Leberzellen, insbesondere bei der Phosphorvergiftung, Arch. Anat. u. Phys., Suppl., 1887.*
Strasburger, *I. Zellbildung und Zelltheilung, 3. Aufl., 1880.*
— *II. Histologische Beiträge, IV, 1892.*
— *III. Karyokinetische Probleme, Jahrb. f. wiss. Bot., 28. Bd., 1896.*
— *IV. Ueber Cytoplasmastructuren, Kern- und Zelltheilung, ibid., 30. Bd., 1897.*
— *V. Kerntheilung und Befruchtung bei Fucus, ibid., 30. Bd.*
— *VI. Bau und Wachsthum der Zellhäute, Jena 1882.*
— *VII. Das botanische Prakticum, 3. Aufl., Jena 1898.*
— *VIII. Ueber den Theilungsvorgang der Zellkerne etc., Arch. mikrosk. Anat., 21. Bd., 1882.*

Strasburger, *IX. Studien über Protoplasma, Jena 1876.*
— *X. Einige Bemerkungen über vielkernige Zellen u. über die Embryogenie von Lupinus, Bot. Ztg., 1880.*
Suzuki, *I. Notiz über die Entstehung des Mittelstückes der Samenfäden von Selachiern, Anat. Anz., 15. Bd., 1898.*
Tellyesniczky, K., *Ueber die Fixirungs- (Härtungs-)Flüssigkeiten, Arch. mikrosk. Anat., 52. Bd., 1898.*
Touton, *I. Ueber Russel'sche Fuchsinkörperchen u. Goldmann'sche Kugelzellen, Virchow's Arch., 132. Bd.*
Trow, *I. The karyology of Saprolegnia, Annals of Botany, Vol. 9, 1895.*
Unna, *I. Ueber weitere Versuche, Farben auf dem Gewebe zu erzeugen u. die chemische Theorie der Färbung, Arch. mikrosk. Anat., 30. Bd., 1887.*
— *II. Die Rosaniline und Pararosaniline, eine bacteriol. Farbenstudie, Monatshefte f. prakt. Dermatol., 1887.*
— *III. Die Entwicklung der Bacterienfärbung, Bacteriol. Centralbl., 3. Bd., 1888.*
— *IV. Ueber die Reifung unserer Farbstoffe, Zeitschr. wissensch. Mikroskopie, 8. Bd., 1891.*
Verworn, *I. Allgemeine Physiologie, 1. Aufl., 1895.*
Wakker, *I. Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzellen, Jahrb. f. wiss. Bot., 19. Bd., 1888.*
Went, F., *I. Beobachtungen über Kern- und Zelltheilung, Ber. Deutsch. bot. Ges., 5. Bd., 1887.*
Weppen, *I. Ueber die Präcipitation verschiedener organischer und anorganischer Stoffe durch thierische Kohle, Liebig's Annalen, 55. Bd., 1845.*
— *II. Ueber die Wirkung der Kohle auf Metallsalze und einige vegetabil. Stoffe, ibid., 59. Bd., 1846.*
Wermienski, *I. Ueber Aleuronkörner, Biol. Centralbl., 9. Bd., 1890.*
Winkelmann, *I. Handbuch der Physik, 1. Bd.*
Witt, O., *Zur Theorie des Färbeprocesses, Färberzeitung, 1890/91, H. 1.*
Wuster, *Die Einwirkung oxydirender Agentien auf Hühnereiweiss, Arch. Anat. u. Phys. Phys. Abth., 1887.*
Zacharias, E., *I. Ueber Chromatophilie, Ber. deutsch. bot. Ges., 11. Bd., 1893.*
— *II. Ueber Eiweiss, Nuclein und Plastin, Bot. Ztg., 1883.*
— *III. Ueber den Zellkern, ibid., 1882.*
— *IV. Ueber die Spermatozoiden, ibid., 1881.*
— *V. Ueber das Verhalten des Zellkernes in wachsenden Zellen, Flora, 81. Bd., 1895.*
— *VI. Ueber einige mikrochemische Untersuchungsmethoden, Ber. Deutsch. bot. Ges., 14. Bd., 1896.*
— *VII. Ueber Nachweis und Vorkommen von Nuclein, ibid., 16. Bd., 1898.*
— *VIII. Beiträge zur Kenntniss des Zellkernes und der Sexualzellen, Bot. Ztg., 1887.*
Ziegler, E., *I. Untersuchungen über die Zelltheilung, Verhandl. Deutsch. zool. Ges., 1895, p. 62—83.*
— *II. Experimentelle Studien über die Zelltheilung, I, Arch. f. Entwicklungsmech., 6. Bd., 1898.*
Zimmermann, A., *I. Ueber das Verhalten der Nucleolen während der Karyokinese, in Zimmermann, Beitr. z. Morphol. u. Phys. d. Pflanzenzelle, 2. Bd., 1893.*
— *II. Ueber die chemische Zusammensetzung des Zellkernes, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 12. Bd., 1896.*
— *III. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, 1. Bd., Tübingen 1890—93.*
— *IV. Die Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, Jena 1896.*
Zimmermann, K. W., *I. Beiträge zur Kenntniss einiger Drüsen und Epithelien, Arch. mikrosk. Anat., 52. Bd., 1898.*

Register.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 1956





